

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年11月7日 (07.11.2002)

PCT

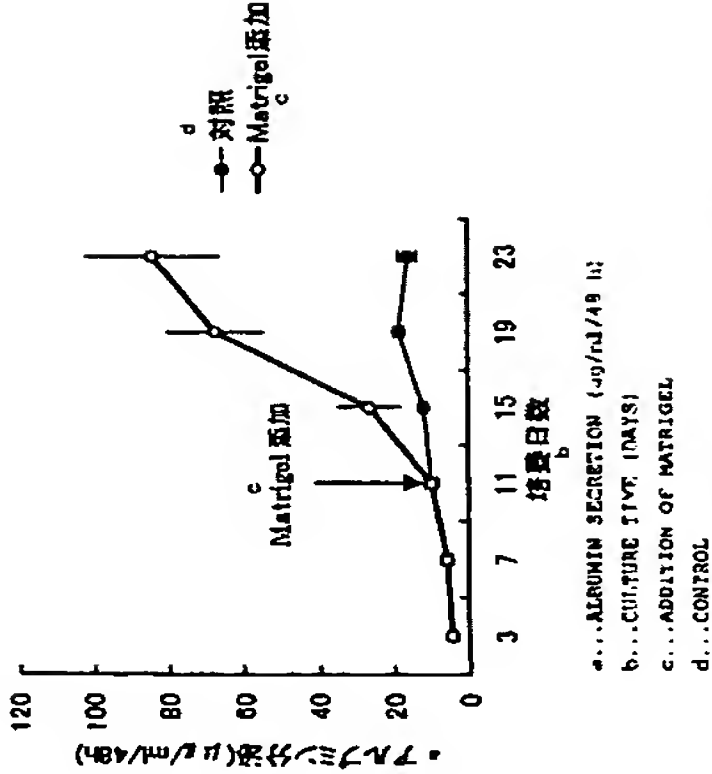
(10) 国際公開番号  
WO 02/088332 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06, C12Q 1/68, A61K 45/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03665
- (22) 国際出願日: 2002年4月12日 (12.04.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-125525 2001年4月24日 (24.04.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道  
テイー・エル・オー株式会社 (HOKKAIDO TECHNOLOGY LICENSING OFFICE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒060-0807 北海道札幌市北区北7条西2丁目8番地1 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 三高 俊広 (MI-TAKA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒004-0861 北海道札幌市清田区北野3条1丁目10番49号 Hokkaido (JP); 〒100-8355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号新東京ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: SMALL LIVER CELL-RICH COLONY, METHOD OF PREPARING THE SAME, METHOD OF MATURING THE SAME INTO LIVER TISSUE AND METHOD OF ESTIMATING DRUG FUNCTION USING THE MATURED SMALL LIVER CELL-RICH COLONY

(54) 発明の名称: 小型肝細胞高含有コロニー、その調製方法、その肝組織への成熟化方法、成熟化した小型肝細胞高含有コロニーを用いた薬物機能の推定方法



(57) Abstract: It is intended to provide a liver tissue which can be transplanted, a cell colony suitable therefor and a method of preparing the same. A small liver cell-rich colony wherein small liver cells constituting the same amount to about 70% or more of the total cells, in particular, a cell colony consisting of about 10 to about 30 cells wherein small liver cells constituting the same amount to about 70% or more of the total

[続葉有]

WO 02/088332 A1



添付公開書類:  
国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

cells. A method of preparing such a small liver cell-rich colony is also disclosed. A method of inducing the maturation of the small liver cell-rich colony into a liver tissue; and a method of estimating the effect of a drug (in particular, an effect relating to normal liver functions) *in vitro* by using the small liver cell-rich colony the maturation of which has been thus induced.

(57) 要約:

本発明により移植可能な肝組織を調製する方法、そのために適した細胞コロニーおよびその調製方法が提供される。

本発明の小型肝細胞高含有細胞コロニーは、全細胞数の約70%以上が小型肝細胞によって構成されている小型肝細胞高含有細胞コロニー、特に、約10個～約30個の細胞からなり、小型肝細胞数が全細胞数の約70%以上を占める細胞コロニーである。このような小型肝細胞高含有コロニーの調製方法も開示される。

また、本発明の小型肝細胞高含有細胞コロニーの肝組織への成熟化を誘導する方法、成熟化を誘導された小型肝細胞高含有細胞コロニーを用いて薬物の作用、特に正常な肝機能と関連した作用を *in vitro* で推定する方法も開示される。

明細書

小型肝細胞高含有コロニー、その調製方法、その肝組織への成熟化方法、

成熟化した小型肝細胞高含有コロニーを用いた薬物機能の推定方法

発明の背景

本発明は、in vitroで肝組織を誘導するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、前記小型肝細胞コロニーからの効率的な肝組織への誘導方法に関する。

ヒトは種々の疾患により、例えば、肝炎、肝硬変、肝癌などにより肝機能不全状態になる。現在のところ人工肝臓は実用段階にあるとは言えないため、このような疾患の根本的な治療は肝臓移植に頼らざるを得ないのが現状である。しかも、我が国を初め世界各国において、肝臓移植を必要としている患者は多数存在するにもかかわらず、臓器を提供するドナーの数は必要数の1割を満たすのがやっとである。従って、肝臓移植に使用できるような肝組織をin vitroで形成させる方法、そのような方法に使用できる肝組織の前駆細胞コロニーおよびそのin vitro調製方法が望まれている。

一方、肝臓はin vivoでは再生力の高い臓器として知られているが、in vitroにおいて肝臓を再生させることは成功しているとは言えない。現在、細胞培養レベルでは、直接肝臓を構成している細胞として、肝細胞、胆管上皮細胞、などを個別に培養増殖できているに過ぎない。また、移植可能な肝組織の調製方法として、器官培養、ES細胞を用いた方法が研究されている。しかしながら、器官培養で充分な大きさの臓器を形成させることは成功しておらず、また、肝臓を形成する全ての細胞をES細胞から調製することにも成功していない。特にES細胞は有望視されているものの、患者それぞれからES細胞を調製する必要がある、更に、肝臓を構成する各細胞を増殖させなければならず、その方法は未だ確立されてい

ない。

このような研究と並行して肝細胞中には種々の薬物代謝酵素が存在することが明らかにされている。この薬物代謝酵素は、外来性および内来性の化学物質(総称して「薬物」と呼ぶ)、たとえば、発癌剤、食品添加物、殺虫剤、ステロイド、プロスタグランジンなどのエイコサノイド、脂質または脂溶性のビタミンなどの、極性が少ない物質、特に比較的脂溶性の物質に作用し、これらの物質を水酸化等の反応により極性を高めて血液中に戻して尿として排出させる、または胆汁中に分泌させることで体内から排除する過程に関与している。この過程にはフェーズI (phase I)およびフェーズII(phase II)の2通り、あるいは2段階の過程が知られている。フェーズIは、極性を増加させる置換基、主として水酸基を付加する反応である。この反応を主として触媒するのはチトクロームP450 (モノオキシゲナーゼ) (CYPシップとも呼ばれる) と呼ばれる酵素群であり約150のアイソザイムが知られている。それらのアイソザイムは反応する物質の構造に対して特異性があり、代表的なものとしてたとえば、CYP1A1、CYP2B1、CYP3A2、CYP2E1、CYP4A1が知られている。ヒトが摂取する薬物のおよそ50%はチトクロームP450酵素群によって代謝されると考えられている。フェーズIIは、フェーズIによって水酸化を含む改変を受けた代謝物等に更に特定の分子を付加することで水溶性を増したり、胆汁に排出され易くする過程であり、この過程に関与する酵素には、グルクロン酸、硫酸、アセテート、グルタチオンおよびアミノ酸を付加する酵素やメチル化酵素が含まれ、その具体例としては、たとえばグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、γグルタミルトランススフェラーゼ(GGT)、グルクロノシルトランスフェラーゼ、アセチルトランススフェラーゼおよびエチルトランスフェラーゼが挙げられる。チトクロームP450を含むこれらの薬物代謝酵素は通常は、いわゆる「解毒」作用に関与していると考えられるが、場合によっては、特定の物質に作用して変異原性物質の生成に関与したり、複数の薬剤を併用して投与する場

合に相互にそれらの薬剤の治療効果を減じる等の有害な影響を及ぼすことがある。

これらの薬物代謝酵素のなかでも、特にP450は臨床医学の立場から重要であると考えられている。たとえば、抗凝固剤のワーファリン(warfarin)はCYP2C9を誘導することが知られている。ワーファリン自体も自身が誘導する薬物代謝酵素により代謝されてしまうが、てんかん発作を起こす患者にワーファリンとフェノバルビタールを投与するとフェノバルビタールによる小胞体過形成が起こりCYP2C9が増加するためにワーファリンの薬効が更に減弱し、臨床的な効果を得るためにはワーファリン単独投与の場合よりもワーファリンの投与量を増加させる必要がある。逆にフェノバルビタールの投与を急に止めるとワーファリンの代謝が低下し、血中濃度が高くなるため患者は出血傾向を呈するようになってしまう。一方、逆に抗鬱剤のイミプラミンなどは薬物代謝酵素遺伝子の発現誘導を抑制するために、イミプラミン投与後に睡眠剤ベントバルビタールを投与すると、ベントバルビタールの代謝が抑制されてベントバルビタール単独投与の場合に比較してその作用時間が長くなるという現象も知られている。また、エタノールを摂取するとCYP2E1が誘導されることが知られている。この酵素は、たばこの煙やある種の溶媒などに含まれている物質を代謝することにより発癌性を持たせることがある。従って、アルコール常飲者でヘビースモーカーは癌になりやすくなるということが考えられている。さらに、CYP4501A1は芳香族炭化水素化合物、例えば3-メチルコラントレンなどを代謝してDNAと反応する物質に換えてしまい、発癌性を持たせてしまうことも知られている。従って、チトクロームP450の種々のアイソザイムの誘導の有無は、新規薬剤の肝毒性試験などでは調べなければならない重要な項目の一つと考えられている。

一方、肝毒性試験を含む薬剤の肝機能に関する作用は in vivo および in vitro 双方の試験が行われるが、in vivo 試験では実験動物の使用および管理を必要とし、さらに臓器相関性が存在するという問題点等が指摘され、in vivo 試験では、

再現性や定量性が充分でない、あるいは、通常は培養細胞または培養組織は薬物代謝酵素系を欠くため複雑な系が必要であったり、試験そのものが行えない等の問題が指摘されていた。このように、肝臓における薬剤の作用、特に肝機能と関連した作用を調べることのできる安定した in vitro 系は確立していなかった。

本発明者は、肝細胞としての機能を充分に維持しつつ、幹細胞のように増殖能の旺盛なある種の細胞が成体肝臓内に存在することを報告し(Mitaka T.ら、Hepatology, 16, 1992, 440-447)、これを小型肝細胞と称してきた。本発明者らは、小型肝細胞はウシ胎仔血清やニコチンアミド、EGFなどを加えた培養液で培養すると、最初単層のコロニーを形成し、やがて、周囲を肝上皮細胞や星細胞等の非実質細胞に囲まれるようになることを示した。また、更に培養を続けると、グルタミン合成酵素やカルボモイルリン酸合成酵素の発現が見られ、ミトコンドリアやペルオキシソーム、グルコーゲン顆粒が顕微鏡的に観察できるようになることを報告してきた。しかしながら、移植可能な程度の肝組織を調製するための小型肝細胞の調製方法、肝組織の誘導方法の開発はなお未解決であった。

### 発明の関示

本発明の目的は、移植可能な肝組織を調製する方法、そのために適した細胞コロニーおよびその調製方法を提供することを目的とする。より具体的には、本発明は移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、その小型肝細胞コロニーから肝組織を誘導する方法を提供することである。

また、本発明の別の目的は、薬物の作用、特に正常な肝機能と関連した作用を in vitro で推定する方法を提供することである。

本発明は、細胞数にして全細胞の約70%以上が小型肝細胞によって構成されている小型肝細胞高含有細胞コロニー、特に、約10個～約30個の細胞からなり、小型肝細胞数が全細胞数の約70%以上を構成する小型肝細胞高含有細胞コロニーで



ある。

また、本発明は、肝臓から単離された、または、継代された培養中の小型肝細胞を培養初期に細胞コロニーとして回収することを特徴とする、移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。特に、本発明は、肝臓から単離された、または、継代された培養中の小型肝細胞を含む10個～30個の細胞からなる細胞コロニーが形成された時点で、非酵素的に単離することを特徴とする、移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。

即ち、本発明は、

- (i) 肝臓より肝細胞を分離すること、
- (ii) 分離された前記肝細胞を、実質細胞をより多く含む重画分と、非実質細胞をより多く含む実質細胞をより少なく含む軽画分とに分画し、前記軽画画分を回収すること、
- (iii) 前記軽画画分中の細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて培養し、小型肝細胞コロニーを形成させること、および、
- (iv) 総細胞数が10個～30個である小型肝細胞コロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。

また、本発明は、

- (i) コロニーを形成している小型肝細胞に酵素を作用させ、または、作用させずに培養皿から剥がし、回収すること、
- (ii) 回収された前記小型肝細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて継代培養し、総細胞数が10個～30個であるコロニーを形成させること、および、
- (iii) 前記総細胞数が10個～30個であるコロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。

更に、本発明は、上述のようにして調製された、小型肝細胞が数にして全細胞

の約70%以上を構成する細胞コロニーである。

また、本発明は、上述のように単離した小型肝細胞高含有コロニーを培養し、更に細胞外基質を添加して一定期間培養し、次に、細胞外基質を添加しない培地で培養することを特徴とする、小型肝細胞コロニーの肝組織への誘導方法である。

特に、本発明は、上述のように単離した小型肝細胞コロニーを生体適合性材質製のシート上に移し、更に一定期間培養することを特徴とする、小型肝細胞コロニーの肝組織への誘導方法である。

本発明は、上述のようにして成熟化させた小型肝細胞高含有コロニーと化学物質を共存させ、前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現が誘導される、または抑制される遺伝子を同定および/またはその発現量を定量化することにより、前記化学物質の肝機能に関連した作用をin vitroで推定する方法である。

特に、本発明は、上述のようにして成熟化させた小型肝細胞高含有コロニーと化学物質を共存させ、前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現が誘導される、または抑制される薬物代謝酵素遺伝子を同定および/またはその発現量を定量化することにより、前記化学物質の肝機能に関連した作用をin vitroで推定する方法である。

本発明は、上述のようにして成熟化させた小型肝細胞高含有コロニーと化学物質とを共存させ、前記化学物質が前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において薬物代謝酵素の発現を誘導または抑制する能力を決定することにより、前記化学物質が生体の肝臓において前記薬物代謝酵素の発現を誘導または抑制するかを決定する方法でもある。

また、本発明は、上述のようにして成熟化させた小型肝細胞高含有コロニーと化学物質を共存させ、前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現が誘導される、または抑制される遺伝子を同定および/またはその発現量を定量化し、

さらに前記発現が誘導された、または抑制された遺伝子の誘導または抑制パターンを作用が既知の化学物質に対する遺伝子発現の誘導または抑制パターンと比較し、前記パターンと類似した誘導または抑制パターンを与える化学物質の肝機能に関連した作用を前記小型肝細胞含有コロニーと共存させた前記化学物質の肝機能に関連した作用として in vitro で推定する方法である。

特に、本発明は、上述のようにして成熟化させた小型肝細胞含有コロニーと化学物質を共存させ、前記小型肝細胞含有コロニー中の細胞において誘導される、または抑制される薬物代謝酵素の遺伝子を同定および／またはその発現量を定量し、さらに前記誘導された、または抑制された薬物代謝酵素の遺伝子の誘導若しくは抑制パターンを作用が既知の化学物質に対する薬物代謝酵素遺伝子の誘導または抑制パターンと比較し、前記パターンと類似した誘導または抑制パターンを与える化学物質の肝機能に関連した作用を前記小型肝細胞含有コロニーと共存させた前記化学物質の肝機能に関連した作用として in vitro で推定する方法である。

より具体的には、本発明は、薬物代謝酵素がチトクローム P450 酵素群である化学物質の作用を推定する前記方法である。

図面の簡単な説明

図 1 は、コロニーを剥離して新しい培地に移した後に接着しているコロニー数を位相差顕微鏡で観察した結果である。コロニーの同定は、培養皿に目印をつけて、それを指標に行なった。6 つの培養皿から得られたデータの平均値と標準偏差を示した。

図 2 は、コロニーを構成する細胞数を示すグラフである。肝細胞マーカーであるサイトケラチン 8 で免疫染色した細胞数を顕微鏡下で数えた結果を示したものである。1 回の実験に 3 枚の培養皿を使用し、2 回の実験から得られたデータの

平均と標準偏差を示した。

図 3 は、Matrigel による C/EBP  $\alpha$  タンパク質の誘導を示したものである。MH：成熟肝細胞、0 (日)：処理開始前、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 4 は、Matrigel による C/EBP  $\beta$  タンパク質の誘導を示したものである。MH：成熟肝細胞、0 (日)：処理開始前、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 5 は、Matrigel による HNF4  $\alpha$  タンパク質の誘導を示したものである。MH：成熟肝細胞、0 (日)：処理開始前、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 6 は、Matrigel による HNF6 タンパク質の誘導を示したものである。MH：成熟肝細胞、0 (日)：処理開始前、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 7 は、培養液中に分泌されるアルブミン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 8 は、培養液中に分泌されるトランスフェリン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 9 は、培養液中に分泌される  $\alpha$ 1-アンチトリプシン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 10 は、培養液中に分泌されるフィブリノーゲン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (Matrigel 無添加)、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

図 1 1 は、培養液中に分泌されるアルブミン量の経時変化を示したものである。

コロニーを分離・播種後 1 1 日間培養し、1 1 日目にMatrigel (500  $\mu$ g/ml) を 2 日間添加した場合と添加しない場合の小型肝細胞のアルブミン分泌量を比較した。

図 1 2 は、トリプトファンジオキシゲナセタンパク質の発現誘導を示したものである。MH：成熟肝細胞、0日：処理開始前、C：対照 (Matrigel無添加)、M：Matrigel添加(500  $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

図 1 3 は、セリンデヒドラーゼタンパク質の発現誘導を示したものである。M H：成熟肝細胞、0日：処理開始前、C：対照 (Matrigel無添加)、M：Matrigel添加(500  $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

図 1 4 は、シート上で培養された小型肝細胞が分泌するアルブミン量の経時変化を示したものである。■：シート上の培養、◆：コラーゲン被覆培養皿上の培養 (対照)。

図 1 5 は、シート上で培養された小型肝細胞によって培養液中に分泌されるトランスフェリン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (コラーゲン被覆培養皿上の培養)、S：コラーゲンシート上の培養をそれぞれ意味する。

図 1 6 は、シート上で培養された小型肝細胞によって培養液中に分泌されるハプトグロブリン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (コラーゲン被覆培養皿上の培養)、S：コラーゲンシート上の培養をそれぞれ意味する。

図 1 7 は、シート上で培養された小型肝細胞によって培養液中に分泌されるフィブリノーゲン量を示したものである。N：正常ラット血清または血漿、C：対照 (コラーゲン被覆培養皿上の培養)、S：コラーゲンシート上の培養をそれぞれ意味する。

発明を実施するための最良の形態

本発明は移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、その小型肝細胞コロニーから肝組織を誘導する方法を提供することである。以下に、本発明のいくつかの実施態様を記載する。なお、本明細書において、「細胞コロニー」または「コロニー」とは、細胞の増殖によって形成された細胞集塊をいい、構成する細胞数とは無関係に使用する。また、「小型肝細胞コロニー」の語は、小型肝細胞を含むコロニーを意味し、コロニーを構成する細胞数およびコロニーに含まれる小型肝細胞の割合とは無関係に使用する。一方、本明細書において「小型肝細胞高含有コロニー」とは、小型肝細胞を含む細胞集塊のうち、その細胞集塊を構成する細胞総数の約70%以上が小型肝細胞であるコロニーをいう。

本発明の方法には小型肝細胞を使用する。本明細書において、「小型肝細胞」とは、単に肝臓に由来する小型の細胞を意味するものではなく、以下に記載する方法、あるいはこれに準じた方法を用いて肝臓から単離される細胞であって、強い増殖能を有し、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン(CK) 8、CK18などのマーカーについて成熟肝細胞とほぼ同様の表現型を示し、超微構造的にも肝細胞としての特徴を有する、肝臓由来の特別な種類の小型の細胞を意味する。この細胞は発明者らによって見出されたものであり、より詳しくはMitaka T. ら、Hepatology, 16, 440-447, (1992)、Mitaka, T, Sato F, Mizuguchi Tら、Hepatology, 29, 111-135 (1999)に記載されている。

本発明に使用する小型肝細胞は、例えば以下のように調製することができる。ヒトその他の動物から採取した肝臓組織をコラーゲナーゼ等を含む溶液で処理すると肝臓由来の細胞を得ることができる。この場合、通常のコラーゲナーゼ肝灌流法を利用することができる。得られた細胞懸濁液は必要に応じて適当な大きさのメッシュ等を通し、未消化の組織残渣その他の組織破砕片等を除去してもよい。こ



の細胞懸濁液をそのまま培養しても小型肝細胞コロニーを得ることもできるが、実質細胞および不要な組織破砕物等を可能な限り除去してから培養することが好ましい。実質細胞の除去は、以下のように低速遠心によって行なうことができる。低速遠心とは、実質細胞および不要な組織破砕物等を多く含む画分と、非実質細胞を多く含む軽画分とを分離するために十分な条件をいい、好ましくは、実質細胞および不要な組織破砕物等を主として含む画分と、小型肝細胞および非実質細胞を多く含む実質細胞をほとんど含まない軽画分とを分離するために十分な条件をいう。このような条件で上述したような方法で得られる肝臓由来の細胞を分画すると、小型肝細胞は前述の軽画分により多く得られる。より具体的には、例えば、この細胞懸濁液を低速遠心、例えば50xgで1分間遠心することにより、主として実質細胞を含む重い画分と、星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞等の非実質細胞を主として含む比較的軽い細胞を含む軽い上清画分とに分画することができる。小型肝細胞はこの遠心条件下で上清画分に多く得られる。

加速度が大きくなるほど、また、遠心時間が長くなるほど上清画分中の実質細胞の割合は減るが、沈殿する小型肝細胞の割合も増加するため、遠心は約50xgにて約1分間以下とするのが好ましい。上清画分は更に遠心、沈殿、懸濁を繰り返して実質細胞および不要な組織破砕物等を除去することもできる。より具体的には、例えば、上清画分を、50xgで5分間遠心し、沈殿を適当な培地に懸濁し、更に50xgで5分間遠心する。沈殿を同様な培地に懸濁し、再び50xgで5分間遠心する。得られた沈殿を同様な培地に懸濁し、150xgで5分間遠心して、沈殿した細胞を新鮮な培地に懸濁する。細胞懸濁液中の細胞数を数え、その後の培養、あるいは処理のために必要な細胞密度となるように調製することができる。通常、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に調製される。

このようにして調製した細胞は、血清、ニコチンアミド、ビタミンC、抗生物質、増殖因子、その他の細胞培養に一般的に使用される添加物を更に含む基本培地、

例えば、これらを添加したダルベッコ改変イーグル培地等で37°Cにて培養することができ、小型肝細胞を増殖させるいは維持するための培地は、ニコチンアミドを含み、更にコロニー形成促進のためにビタミンC、増殖因子、DMSO等を含むことが好ましい。ビタミンCは通常、アスコルビン酸2リン酸として添加し、その濃度は、好ましくは0.1mM～1.0mM、より好ましくは、0.5mM～1.0mMであり、ニコチンアミドは比較的高濃度で使用され、好ましくは1～20mM、より好ましくは5mM～10mMで使用する。増殖因子としては、上皮細胞増殖因子（EGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ （TGF $\alpha$ ）等が利用でき、TGF $\alpha$ が特に好ましい。TGF $\alpha$ を添加する場合には、好ましくは $1 \mu\text{g/l} \sim 100 \mu\text{g/l}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{g/l} \sim 50 \mu\text{g/l}$ の濃度で使用する。

また、初代培養においてはDMSOは培養開始4日目から好ましくは約0.1～約2%（v/v）、より好ましくは約0.5%～約1.5%（v/v）の濃度で添加する。肝組織への誘導のためには、前述と同じ組成の培地にDMSOは継代1日目から1%の濃度で培地に添加するのが好ましい。また、小型肝細胞の初代培養および継代維持のために、血清たとえばウシ胎仔血清（FBS）を添加することができるが、移植のための肝組織への誘導のためには不要なタンパク質の混入を避けるために無血清培地を使用することが好ましい。血清を用いる場合は、拒絶反応を最小限に抑えるために、移植対象の動物種由来の血清を用いることが好ましい。培地はほぼ1日おき、通常、週に3回交換する。

本発明で使用する小型肝細胞または小型肝細胞高含有コロニーの培養容器としては、通常の細胞培養に使用される培養皿を使用することができる。一般には接着細胞の培養はコラーゲン被覆をした培養皿が使用され、例えば、ウシ真皮、ラットの尾部由来のコラーゲンを被覆した種々の大きさの培養皿が商業的に入手可能であり、また必要であればそのような培養皿を調製することもできる。本発明においても小型肝細胞の培養にもそのような培養皿を使用することができるが、

肝組織形成に適した小型肝細胞コロニーを調製するためにはコラーゲンを被覆しない培養皿を使用することが好ましい。なぜならば、細胞外基質が少ないほどより温和な条件で細胞が剥がれやすく、かつ、コラーゲン等で被覆しない場合には、小型肝細胞が優先的に容器から剥離する傾向があるからである。本発明においては、培養は60皿の培養皿あたり、比較的高密度、具体的には約  $4 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$  個の細胞密度で開始するのが好ましい。培養には、通常の5%炭酸ガスインキュベーターを使用することができる。炭酸ガス濃度および培養温度は、通常の培養細胞に許容される範囲であれば本質的ではない。

このような条件で培養すると、約1週間程度で明瞭なコロニーが確認できるようになる。このときのコロニーを構成する細胞数は約10～約30個程度である。本明細書において、培養期間について「早期」というのは、このような時期をいう。上記培養条件下で培養した場合、この時期に見られる細胞コロニーは主として小型肝細胞からなり、非実質細胞によって周囲を完全に包囲されるには至っていない。

本発明においては、小型肝細胞以外の細胞、例えば星細胞や肝上皮様細胞等を含む非実質細胞、を可能な限り含まない小型肝細胞コロニーを使用することが好ましい。具体的には、例えば、コロニーを構成する細胞総数の約70%以上を小型肝細胞が占めるコロニーを使用することが好ましく、より好ましくは、コロニーを構成する細胞総数の約80%以上、特に好ましくは85%以上が小型肝細胞であるコロニーが使用される。前述のような方法で肝臓から単離した小型肝細胞を前述のような培地および条件で培養した場合に生じる、細胞数が約10～約30個からなるコロニーは一般にそのような条件を満たしている。従って、本発明の肝組織調製方法のために、このような早期に単離される小型肝細胞コロニーを利用することができる。

形成されたコロニーは以下のような温和な条件、例えば非酵素的で培養容

器から剥離して、新しい培地に移すことが好ましい。例えば、金属キレート剤および種々の非酵素的剥離剤を使用して非酵素的に細胞を培養皿から剥がすのが好ましい。使用し得る金属キレート剤としては、細胞毒性の少ないものであればよく、接着細胞の剥離処理に一般的に使用されるもの、例えばEDTA、EGTA及び／またはその塩を、それぞれについて一般的な濃度で使用することができる。EDTAのナトリウム塩が特に好ましく、好ましくは0.01～0.05%(w/v)、より好ましくは0.01～0.02%(w/v)の濃度で使用される。EGTAナトリウム塩の場合は、約0.5mMで使用するのが好ましい。処理時間は、細胞をリンスする程度（数秒間）に短くてもよいが、好ましくは約30秒～約10分間、より好ましくは約1分間～約5分間である。長時間の処理は細胞に与える損傷が大きいため、可能な限り短くすることが好ましい。

非酵素的細胞剥離剤としては、Ca、Mgを含まないHanksの緩衝液(pH7.3～7.5)にEDTA、グリセロール、クエン酸ナトリウム等を添加した溶液が利用でき、例えばSigma社からCell dissociation solutionの名で調製済みの非酵素的細胞剥離剤を商業的に入手することができる。より具体的には、例えば約0.02%のEDTAを含むリン酸緩衝液を細胞上に注ぐ。数分間静置し、その後EDTA溶液を除いた後、Cell dissociation solutionのような非酵素的細胞剥離剤を注ぎ、例えば37°Cにて約5分間～約30分間、好ましくは約10分間～15分間静置する。細胞に与える損傷を最小限にするため、非酵素的剥離剤による処理も金属キレート剤処理と同様、可能な限り短くするのが好ましい。次に、細胞に与える損傷を最小限にすべく、静かにピペティングすることにより培養皿から小型肝細胞高含有コロニーを剥がす。本発明の小型肝細胞高含有コロニーは、酵素を使用しないこのような温和な条件でも極めて剥離しやすく、上述した方法によって早期にコロニーを単離することにより、小型肝細胞以外の細胞、特に非実質細胞の混入を更に低く抑えることができる。



必要に応じてこのコロニーを遠心、懸濁を繰り返すことにより洗浄し、最後に適切な培地等に懸濁する。場合により、位相差顕微鏡等を用いてコロニーあたりの細胞数および／または小型肝細胞の割合を測定してもよいが、上述したように早期にコロニーを単離すれば通常は不要である。コロニー数は例えばIPlabのような画像解析プログラムを用いて計測することができる。また、コロニーを構成する細胞数は、アルブミンやサイトケラチン8染色のようなマーカで免疫染色して位相差顕微鏡を用いて測定することができ、また、位相差顕微鏡とCCDカメラを用いてコンピュータに画像を記録し、経時的に測定することもできる。

増殖維持のために継代する場合において使用する培地は、肝臓から直接得られた小型肝細胞を得る場合と同様にニコチンアミド、ビタミンC、増殖因子、DMSO等を含む培地を用いることができ、ニコチンアミド、ビタミンC、増殖因子、DMISO等の濃度も同様である。肝組織形成のために継代する場合も同等の培地が使用できるが、肝組織移植に不要なタンパク質の混入を最小限にするため、前述したように無血清とすることが好ましい。

また、このように早期に単離され、非実質細胞を約30%未満程度しか含まない小型肝細胞コロニーは、増殖因子に対する依存性が強度に低下し、増殖因子を実質的に含まない培地でも培養可能である。従って、増殖因子が増殖のために必須でないことも本発明の小型肝細胞高含有コロニーが有する特徴の一つである。更に、単離された本発明の小型肝細胞高含有コロニーの他の特徴は、上述のような培地で継代培養した場合、肝細胞以外の細胞が少ないために成熟化がおりにくく、平面的に増殖を続けることである。

このようにして肝臓から直接単離された細胞から形成された小型肝細胞高含有コロニーはそのまま培養を続けると、成熟化せずに増殖させることができる。増殖した小型肝細胞コロニーを上述したような非酵素的方法で単離し、さらに継数約10個以下のコロニーに分割して継代培養することもできる。そのように継

代されたコロニーは上述したような培地を用いて細胞数約10個～約30個のコロニーを形成するまで培養することができる。この方法で形成される細胞数約10個～約30個のコロニーもまた本発明の小型肝細胞高含有コロニーに含まれる。この継代操作を1以上繰り返して得られる細胞数約10個～約30個のコロニーもまた本発明の小型肝細胞高含有コロニーに含まれる。

上述のように培養して形成された主として小型肝細胞からなる小型肝細胞高含有コロニーは、更に細胞外基質の存在下で短期間培養し、続いて細胞外基質を含まない培地で培養することにより生体内の肝細胞に極めて近くまで成熟化を誘導することができる。

小型肝細胞の割合が細胞数にして約70%以上である小型肝細胞高含有コロニー、好ましくは約10～約30個の細胞からなり小型肝細胞の割合が細胞数にして約70%以上である小型肝細胞高含有コロニーを500～10,000コロニー/ml、好ましくは、1,000～4,000コロニー/ml、より好ましくは1,500～3,000コロニー/mlの濃度で200～1000コロニー/cm<sup>2</sup>、好ましくは250～500コロニー/cm<sup>2</sup>になるように培養皿に播き、前述したような培地（無血清）で培養する。肝組織への成熟化を誘導するためには、培養皿中であまり密になりすぎないように培養することが好ましい。例えば、約10日間～14日間培養すると、小型肝細胞高含有コロニーは面積で約5倍、細胞数にして約6倍ほどに増殖し（図1、2）、培養皿の底面積の約20%～30%程度が細胞で覆われる。細胞外基質を添加する時期としては、このような時期のコロニーが特に好ましい。成熟化の誘導は、ラミニン、コラーゲン、種々のプロテオグリカン、エンタクチン、フィブロネクチン等を含む細胞外基質を50μg/ml～1mg/ml、好ましくは100μg/ml～1mg/mlの濃度で培養液に添加することによって促すことができる。

このような濃度の細胞外基質と共に約1～3日間培養し、その後細胞外基質を含まない培地で培養を続けることにより、小型肝細胞コロニーの成熟化は顕著に進

む。例えば、細胞外基質を含まない培地に戻した翌日から小型肝細胞の形態変化が明瞭に観察される。そのまま細胞外基質を含まない培地で培養すると、小型肝細胞の成熟化は更に著しく進行し、コロニーは大型化するとともに成熟化して生体内肝組織に極めて近い構造を形成する。小型肝細胞の成熟化に使用し得る細胞外基質としては、ラミニン、IV型コラーゲンを含むことが好ましく、基底膜成分（例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、ラミニン）の多くを含むことがより好ましい。たとえば商業的に入手可能な、商品名マトリゲル（Matrigel）の名称で販売されている（Collaborative Biomedical Products社）、Engelhorn肉腫（EHS）から抽出された細胞外基質調製物（ラミニン60%、IV型コラーゲン15%、プロテオグリカン、エンタクチン等を含む）が特に好ましい。

このようにしてin vitroで形成された、生体内肝組織に極めて近い組織は、肝機能の種々の研究に使用することができるのみならず、肝移植に使用することができる。

本発明の小型肝細胞高含有コロニーを生体適合性であって生体吸収性または生分解性材料からなるシート上に置くことによって、肝組織移植に特に適した肝組織を形成させることができる。なお、本明細書において「生体吸収性」とは主として生体の生理作用によって代謝され若しくは細胞内に取り込まれる性質を言い、「生分解性」とは生体の生理作用によって分解される性質を言うが、両者は重複する部分もあるため厳密に区別せずに使用する。また、本明細書において「生体適合性」とは生体によって問題となるほど異物として認識されない性質を言う。

本発明に使用し得る生体適合性かつ生体吸収性シートは繊維構造を有すること好ましい。すなわち、本発明の方法において、シートの繊維構造によって形成される腔に本発明の小型肝細胞高含有コロニーが入り込み、腔内の狭い環境において自身が分泌する細胞外基質の濃度が高まるために成熟化が著しく刺激され、さらに、狭い空間のなかで細胞間の接着面積が増大するために個々の細胞の立体

化が促され、それらの総合的結果として肝組織が形成される。したがって、本発明の方法に使用するシートはひだ状の構造を有するシートであることが好ましい。

本発明で利用し得る生体適合性かつ生体吸収性材料には例えば、コラーゲンシート、コラーゲンスポンジおよびポリグリコリコール酸シートが含まれる。商業的に入手可能なそのような材料としては、例えば、Integra Life Sciences Corporationからヘリスタット（Helistat）の商品名の下に販売されている吸収性コラーゲンシート、および、グンゼ社からネオヴェイル（Neoveil）の商品名の下に販売されている吸収性ポリグリコリコール酸フィルムが挙げられる。

本発明の小型肝細胞高含有コロニーを上述のようなシート上に置く場合は、液量を少なくするため比較的高濃度、例えば500～10,000コロニー/ml、好ましくは1,000～4,000コロニー/ml、より好ましくは1,500～3,000コロニー/mlの濃度に調製した細胞懸濁液を、200～1,000コロニー/cm<sup>2</sup>、好ましくは250～500コロニー/cm<sup>2</sup>になるようにシートに滴下する。コロニーがシートに充分接着するまで静置する。

静置時間はコロニーがシートに接着するに充分であればよいが、少なくとも20分間以上、好ましくは30分間以上、特に好ましくは1時間以上である。その後、+小型肝細胞の培養に適した培地を加える。この培地は、小型肝細胞を肝臓から単離する際に使用する培地でよいが、無血清であることが好ましい。実施例中の表2に記載した小型肝細胞培養液IIは本発明の小型肝細胞高含有コロニーをシート上で培養するために好ましい培地である。このような条件下で培養すると、シート上の小型肝細胞コロニーの成熟化は著しく進行し、コロニーは大型化するとともに成熟化して約10日～約15日で生体内肝組織にきわめて近い構造をシート上で形成する。更に培養を続けて肝組織を増殖させてもよい。しかしながら、生体吸収性または生分解性シートは培養液中で溶解する傾向があるため肝移植のためには培養期間は約3週間までとするのが取り扱い上好ましい。

本発明の小型肝細胞高含有コロニーは、生体適合性であって生体吸収性または

生分解性材料からなるシート上に置き、更に細胞外基質を添加することによって、肝組織移植に特に適した肝組織を形成させることができる。この場合の細胞外基質を添加する時期、濃度、使用できるシート、および成熟化に使用する細胞数等の条件は、細胞外基質およびシートを単独で使用する場合と同等であってよい。しかしながら、細胞外基質の濃度は適宜低下させてもよい。例えば、コロニーがシートに充分に付着した後、すなわち、シートに載せてから約1時間後以降にラミニン、IV型コラーゲンやそれらを含むMatrigel等を100～1,000mg/lの濃度になるように培養液に加えることにより成熟化を促進させることができる。細胞外基質は1度投与すればよく、その後は細胞外基質を含まない培養液で培養してよい。

このようにしてシート上で形成された肝組織は、シートごとそのまま肝移植に使用することができる。

上述のように、細胞外基質の添加、またはシート上での培養によって成熟化したコロニーに含まれる細胞の肝細胞としての性質は種々のマーカーを解析することによって確認することができる。使用するマーカーは成熟前の小型肝細胞、例えば、単離直後の小型肝細胞高含有コロニーに比較して成熟肝細胞において顕著な差異がみられるマーカーであればよい。例えば、肝細胞特異的マーカーとして知られる種々の既知のマーカーが利用できる。

解析は例えば以下のように行なうことができる：細胞を適当なバッファー、例えば、Hepesバッファー（10mM Hepes、0.25M シュウ酸、0.5mM MgCl<sub>2</sub>）に懸濁し、マイクロスリンジによって機械的に細胞を破壊する。得られた細胞ライセートを密度勾配遠心等により細胞膜分画、細胞質分画、核分画に分け、各画分のタンパク質をSDS-PAGEによって解析することができる。あるいは、培地中に分泌されるアルブミンやフィブリノーゲンのような肝細胞特異的マーカーを同様に解析してもよい。

小型肝細胞の成熟化の指標となり得る肝細胞特異的マーカーとしては、例えば、HNF4、HNF6、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、およびトリプトファンジオキシゲナーゼ(TO)あるいはセリンデヒドロゲナーゼ(SDH)のホルモン誘導発現、トランスフェリン、 $\alpha$ -アンチトリプシン、フィブリノーゲン、アルブミン等が挙げられる。

シート上に形成された肝組織は取り扱いが容易であるため、シート上に形成された肝組織は肝移植の目的に特に適している。移植は、培養時に培養液面側であった方、すなわち、肝組織が主として形成されている側を臓器側にして密着させ、その縫合または手術用のホッチキス等で固定すればよい。必要に応じて動物にF<sub>506</sub>等の免疫抑制剤を投与してもよい。シートは生体吸収性であるため、通常、約1～2週間程度で生体に吸収され、シート上に存在していた肝組織は生体内の肝臓に活着する。

また、上述した本発明の方法により、成熟化を誘導された小型肝細胞高含有コロニーは、化学物質と共存培養することにより、その化学物質に応じた遺伝子の発現、特に薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導することができる。たとえば、成熟化を誘導された小型肝細胞高含有コロニーに対して、特定の薬物代謝酵素を誘導または抑制する化学物質は、生体における肝臓に対してもその薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導または抑制すると推定することができる。また、特定の薬物代謝酵素によって代謝された結果、変異原性を獲得する可能性のある化学物質の *in vitro* 変異原性試験において、あらかじめ特定の化学物質によって成熟化を誘導された小型肝細胞高含有コロニーにおいてその薬物代謝酵素の発現を誘導しておき、その後試験すべき化学物質を小型肝細胞高含有コロニー添加することができる。

ここで、「薬物代謝酵素」とは、一般に肝臓において種々の化学物質の酸化、還元および付加反応等の反応を触媒し、歴史的にはいわゆる「解毒作用」に関与する酵素群として当業者に広く認識されている酵素群をいい、「肝薬剂代謝酵素」と呼ばれることもある。



することができる。本方法により、1以上の薬剤を同時に投与する場合に、それらが生体に与える単独、または複合的な作用を推定することもできる。たとえば、特定の薬剤による治療を受けている患者に対して、新たな薬剤を投与する場合にその新たな薬剤の投与の妥当性、投与量の増減を in vitro で評価することができる。あるいは、その患者の生活習慣が、特定の薬剤の投与によってどのような影響を受けるかを推測することもできる。従って、本発明においてその発現を調べるべき遺伝子としては、薬物代謝酵素をコードする遺伝子（薬物代謝酵素遺伝子）が特に好ましい。

ヒトが摂取する化学物質のおよそ50%がチトクローム P450 酵素群によって代謝されると考えられているため、チトクローム P450 の種々のアイソザイム、たとえば、CYP1A1、CYP2B1、CYP3A2、CYP2E1、CYP4A1 は、本発明において誘導の有無を調べる薬物代謝酵素として特に適している。これらのチトクローム P450 アイソザイムは、通常組織ではあまり強く発現しておらず、特定の化学物質を投与した場合に投与された化学物質に依存したアイソザイムが顕著に誘導されるという特性を有しているため、検査の容易さの点でも本発明の方法に適している。

本発明の方法によってその作用を推定し得る化学物質は特に限定されないが、レセプターを介せずに細胞内に取り込まれ易いと考えられる物質が好ましく、たとえば極性の比較的低い物質が好ましく、脂溶性物質がより好ましいが、更に、操作上の利便性を考慮すれば、水性媒体に可溶化または容易に分散できることが特に好ましい。生体内においては、肝臓に達する際には脂溶性物質であっても比較的濃度または水性媒体に可溶化または分散された状態であると考えられる。従って、たとえば、脂溶性物質であっても比較的低い濃度では水性媒体に溶解する化学物質は本発明の方法に適している。また、細胞培養において顕著な害を与えないとして当業者に知られる有機溶媒、たとえばエタノール、メタノールおよびジメチルスルホキシドに可溶性であれば、それらの有機溶媒に溶解し、それら

更に、本発明により、小型肝細胞高含有コロニーから成熟化を誘導されて得られた肝組織は、与えられた化学物質と共存培養し、その化学物質の小型肝細胞高含有コロニーにおける特定の遺伝子発現に対する作用、特に薬物代謝酵素遺伝子発現の誘導能または抑制能を調べることににより、その化学物質の作用、特に肝機能と関連した作用を推定するために使用することができる。肝機能と関連した作用とは、正常な肝臓の機能に対する直接の作用、たとえば薬物代謝酵素発現の誘導または抑制、および、正常な肝臓の機能によって代謝された結果生ずる生成物を介した生体内における二次的作用、たとえば、そのような生成物を介した肝臓以外の他の細胞または組織に対する作用が含まれる。たとえば、上述したような、エタノールが肝臓において CYP2E1 を誘導する作用を有する結果、生成した CYP2E1 がヘプスモーカーの体内において発ガン性物質を生成させるという二次的作用が含まれる。

この薬物代謝酵素は、既に述べたように外来性および内来性の化学物質、たとえば、発癌剤、食品添加物、殺虫剤、ステロイド、プロスタグランジンなどのエイコサノイド、脂質または脂溶性のビタミンなどの物質、特に比較的極性が比較的低い物質や一般に脂溶性物質を称される物質に作用し、これらの物質を水酸化して極性を持たせて血液中に戻して尿として排出させる、または胆汁中に分泌させることで体内から排除する過程に関与している。これらには、フェーズ I に関与する、チトクローム P450 アイソザイム（たとえば、CYP1A1、CYP2B1、CYP3A2、CYP2E1、CYP4A1）、フェーズ II に関与する、グルクロン酸、硫酸、アセテート、グルタチオン、アミノ酸を付加する酵素やメチル化酵素、より具体的には、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)、γグルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、グルクロノシルトランスフェラーゼ、アセチルトランスフェラーゼおよびエチルトランスフェラーゼが含まれる。本発明においても、これらの薬物代謝酵素遺伝子発現の誘導または抑制の有無を、与えられた薬物の作用を推定するために利用

化小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現する遺伝子を同定および／またはその発現量を定量することにより、その化学物質による特定の遺伝子発現、たとえば薬物代謝酵素遺伝子の発現の抑制の有無が調べられる。

遺伝子の発現は、mRNA レベル、あるいはタンパク質レベルで検出、同定および定量することができる。従って、上述の操作における誘導または抑制される遺伝子発現の同定および／または遺伝子発現量の定量は、特定のタンパク質、たとえば、誘導されるまたは抑制される薬物代謝酵素タンパク質（その例は上述した）自体について同定および定量してもよく、薬物代謝酵素 mRNA について同定および定量してもよい。mRNA およびタンパク質の同定および／または定量は当業者に知られた一般的方法によって良く、たとえば、mRNA についてはノーザンブロット法を使用することができ、タンパク質については SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびウエスタンブロッティング法等をもちいることができる。種々の薬物代謝酵素に対する特異的抗体は商業的に入手することも可能であり、必要であれば当業者に知られた常法に従って調製することができる。

実施例

本発明は、以下の実施例および添付の図面によってより容易に理解されるであろう。これらの実施例および図面は本発明の理解を助けるために記載されるものであり、いかなる意味でも本発明を限定するためであると解してはならない。

実施例 1. 小型肝細胞の分離方法

(1) 肝臓組織からの小型肝細胞の単離

成熟ラット（10～15週齢）の肝臓を Seglen の方法に準じて、0.2mM EGTA を加えた Ca、Mg を含まないハンクス液で門脈から灌流した。40ml/分の流速で前述のハンクス液を 4 分間流した後、0.02% コラゲナーゼ（ヤクルト）を含むハンク

の有機溶媒の最終濃度が、やはり細胞培養において顕著な害を与えないとして当業者に知られる濃度となるような範囲で使用することもできる。このような化学物質には、エタノール等のアルコール、種々の芳香族炭水素化合物、ステロイドを含む種々のホルモン、メチルコラントレン等の発癌物質、フェノバルビタール等の睡眠剤、抗うつ剤、アミノピリン等の解熱鎮痛剤を含む種々の化学物質が含まれる。これらの物質は、薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導する場合も、発現を抑制する場合もある。

一般に、本明細書において、「発現の抑制」には、既に特定の遺伝子、たとえば、薬物代謝酵素遺伝子の発現が誘導されている場合にこれを低下させる場合、特定の遺伝子の発現、たとえば、薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導する薬剤と共存させた場合に発現の誘導を抑制する場合が含まれる。また、本明細書において、遺伝子の「発現」は転写レベル、翻訳レベルのいずれの場合も含む。従って、本発明においては、mRNA の量に有意な変化がなくても翻訳速度の増加により遺伝子産物が増加すれば「発現が誘導された」と考える。

本発明による化学物質の作用を推定する方法においては、本発明の方法によって成熟化した小型肝細胞高含有コロニーを、種々の濃度の作用を調べたい化学物質と共存培養し、成熟化小型肝細胞高含有コロニー中の細胞中で発現する遺伝子を同定および／またはその発現量を定量することにより特定の遺伝子の発現、たとえば薬物代謝酵素遺伝子発現の誘導の有無が調べられる。あるいは、特定の遺伝子の発現、たとえば薬物代謝酵素をコードする遺伝子の発現を誘導することが分かっている化学物質と同時に作用を調べたい化学物質と本発明の方法によって成熟化した小型肝細胞高含有コロニーとを共存培養する、または、そのような化学物質を用いて本発明の方法によって成熟化した小型肝細胞高含有コロニーにおいて前述の遺伝子の発現を誘導した後に、作用を調べたい化学物質と前述の薬物代謝酵素発現を誘導しておいた小型肝細胞高含有コロニーとを共存培養し、成熟

表 1. 小型肝細胞培養培地I

ダルベッコ改変イーグル培地 (GIBCO Laboratories)
+20mM HEPES (Dojindo)
+25mM NaHCO <sub>3</sub> (Katayama Chemical Co.)
+30mg/l L-プロリン (Sigma Chemical Co.)
+0.5mg/l インスリン (Sigma Chemical Co.)
+10 <sup>-7</sup> M デキサメタゾン (Sigma Chemical Co.)
+10% FBS (Hyclone Laboratories, Inc.)
+10mM ニコチンアミド (Katayama Chemical Co.)
+1mM L-アスコルビン酸2-ホスフェート (Wako Pure Chemical Inc.)
+10 μg/l EGF
+抗生物質
(+ 1 % ジメチルスルホキシド(DMSO)* (Aldrich)

\* DMSOは培養 4 日目の培地交換から添加する。

実施例 2. 小型肝細胞高含有コロニーの単離

実施例 1 のようにして単離した小型肝細胞の培養後約 1 週間経過後、小型肝細胞のコロニーが明瞭に確認できるようになった時期に、以下のように小型肝細胞含有コロニーを調製した。

滅菌したリン酸緩衝液で細胞を 2 回洗浄した。その後、0.02% EDTA を含むリン酸緩衝液に細胞を浸した。数分間静置した後、リン酸緩衝液を吸引した。酵素を含まない細胞剥離液(Cell dissociation solution (Sigma)) 1 ml を培養皿に入れ、37℃にて15分間静置した。次に、細胞に損傷を与えないように、細胞を静かにピペティングすることによって培養皿から細胞を慎重に剥がした。細胞を遠心管に集め、50 x g で 5 分間遠心した。上清を吸引した後10%血清を含む培養液で洗い、再び遠心した。上清を吸引後、種々の量の下記を表 2 に記載した無血清の培養液

ス液を20ml／分の流速で1 0 分間流した。消化された肝臓から常法に従って肝細胞をピーカー内にふるい落とし、細胞懸濁液を70 μmのメッシュフィルターで濾過し、50 x g で1 分間遠心した。上清を集め、再び50x g で5 分間遠心した。沈殿した細胞を培養液 (Leibovitz L-15、10%ウシ胎仔血清、10<sup>-7</sup>Mデキサメタゾン、0.5 μg/ml インスリンおよび抗生物質) で洗浄し、50 x g で5 分間遠心した。同様の操作をもう一度繰り返し、更に150 x g で5 分間の遠心を2 回繰り返した後、再び50x g で5 分間遠心した。沈殿した細胞を新しい培養液で懸濁し、小型肝細胞とした。生細胞数を数え、細胞密度を1.0~2.0 x 10<sup>5</sup>個/mlに調整した。

(2) 小型肝細胞の培養

(1) に記載したようにに調製した細胞を60mm培養皿に約 6 x10<sup>5</sup>個／培養皿の割合で播いた。空気培養基で3 時間静置した後、培養液を取り替えた。培養液としては、以下の表 1 に示す、ダルベッコ改変イーグル培地を基本とした培地（小型肝細胞培養培地 I）を用いた。細胞は5 %炭酸ガス培養器で37℃にて培養し、約2 日に1 回の割合で培地交換を行なった。培養後約 1 週間経過後に小型肝細胞のコロニーが明瞭に認識できるようになった。



継代後約2週間して、培養容器底面の約20%~約30%がコロニーで占められるようになった時点(約20%~約30%コンフルエント)で、Engelhorn肉腫(EHS肉腫)から抽出した細胞外基質(商品名マトリゲル(Matrigel):基底膜成分からなり、ラミニン60%、IV型コラーゲン15%、プロテオグリカン、エンタクチン等を含む)を500μg/mlの濃度で培養液に添加した。

更に2日間培養後、培養液をMatrigelを含まない培養液に交換し、再び培養を続け、48時間毎に肝細胞特異的マーカーを測定した。

その結果、Matrigelによる誘導後第2日目~第10日目で、成熟肝細胞のみに発現すると考えられる転写因子のC/EBPα、C/EBPβ、肝細胞核因子4(HNF4)および肝細胞核因子6(HNF6)などが顕著に誘導された(図3~図6)。これらの因子の誘導の確認は、20μgの核抽出タンパク質を電気泳動し、ウェスタンブロットを行ない、各バンドの相対強度を測定することによって行なった。陽性対照としては成熟肝細胞のタンパク質を用い(NH)、陰性対照としてはMatrigelを添加しない小型肝細胞高含有コロニーからの抽出タンパク質(C)を使用した(図3~図6)。

更にこれらの転写因子によって発現が調節されると考えられているトリプトファン-2-ジオキシゲナーゼ(TO)、セリンデヒドラターゼ(SDH)のホルモン誘導が見られるようになった(図12、13)。誘導の確認は、以下のように行なった: 小型肝細胞高含有コロニーに500μg/mlのMatrigelを添加し、その後、培養9日目に10<sup>-6</sup>Mデキサメタゾンおよび10<sup>-7</sup>Mグルカゴンを添加した。24時間後に細胞を集め、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質の20μgをウエスタンブロット解析にかけ、各バンドの強度を測定し相対強度を測定した。陽性対照としては成熟肝細胞のタンパク質を用い(NH)、陰性対照としてはMatrigelを添加しない小型肝細胞高含有コロニーからの抽出タンパク質(C)を使用した。

また、アルブミン、トランスフェリン、α1-アンチトリプシン、フィブリノー

(小型肝細胞培養培地II)を加えて細胞懸濁液を調製し、小型肝細胞コロニーの濃度を測定した。小型肝細胞コロニーの濃度は500~10,000個/mlとした。

このように調製した小型肝細胞コロニーを構成する細胞総数は、位相差顕微鏡で確認したところ18.5±9.4個であった。また、小型肝細胞コロニーに占める小型肝細胞の割合は、約70%~約90%であった。

表2. 小型肝細胞培養培地II

ダルベッコ改変イーグル培地	(GIBCO Laboratories)
+20mM HEPES	(Dojindo)
+25mM NaHCO <sub>3</sub>	(Katayama Chemical Co.)
+30mg/l L-プロリン	(Sigma Chemical Co.)
+0.5mg/l インスリン	(Sigma Chemical Co.)
+10 <sup>-6</sup> M デキサメタゾン	(Sigma Chemical Co.)
+10mM ニコチンアミド	(Katayama Chemical Co.)
+1mM L-アスコルビン酸2-ホスフェート	(Wako Pure Chemical Inc.)
+10μg/l EGF	
+抗生物質	
(+1% ジメチルスルホキシド(DMSO)*	(Aldrich)

\* DMSOは培養1日目から添加する。

実施例3. 小型肝細胞の肝組織への誘導(1)

実施例2で得られた小型肝細胞含有コロニーを1.5~3.0x10<sup>3</sup>コロニー/培養皿になるようにコロニーごと培養皿(直径35mmのディッシュ)に入れた。

そのまま5%炭酸ガス培養器で37°Cにて培養した。継代後約1週間で小型肝細胞コロニーは第1日に比較して面積で平均3倍のコロニーを形成し、細胞数にして5倍まで増殖した(図1、2)。

ゲンの培養液中の分泌も確認された（図7～10）。これらのタンパク質の分泌は、1  $\mu$ lの培養上清を電気泳動し、ウェスタンブロットを行ない、各バンドの相對強度を測定することによって行なった。陽性対照（N）としては正常ラット血清または血漿を用い、陰性対照（C）としてはコラーゲン被覆培養皿で培養した小型肝細胞高含有コロニーの培養上清を使用した（図7～10）。

代表的な結果である、アルブミンの培養液中への分泌のより詳細な経時変化を特に図11に示した。これらの結果は、小型肝細胞の成熟化、すなわち肝組織への誘導が細胞外基質によって著しく加速されることを示すものである。

細胞外基質が接触した小型肝細胞は、急速にその体積を増し、細胞質が大きくなった。しかしながら、培養皿に接している面の面積はあまり大きくならないため、増えた体積分だけ文が高くなり隣り合う細胞との接触面が大きくなった。細胞間には、細胞間結合がよく発達し、タイト結合で強固に結合し、その間には毛細胞管が形成され、その中には胆汁に類するものも分泌可能になった。また、ギャップ結合もよく発達するようになり、細胞間コミュニケーションが良くなった。細胞質には、ミトコンドリア、ゴルジ装置、ペルオキシソームなどの細胞内小器官がよく発達し、グリコーゲン顆粒もよく見られるようになった。これらの結果は小型肝細胞が生体内の成熟肝細胞と同様の機能を持ちうることを示すものである。

#### 実施例4. 小型肝細胞の肝組織への誘導（2）

実施例2で調製された小型肝細胞コロニーを細胞コロニーごと吸収性コラーゲンシート（商品名Helistat）または吸収性ポリグルコール酸フェルトシート（商品名Neovell）上に載せた。

2.5cm x 2.5cmの大きさの上述のシートに、実施例2で調製された小型細胞コロニー懸濁液（1,500～3,000コロニー/ml）をゆっくりと滴下した。充分な小型肝細胞

細胞コロニー（総細胞数、約2,800～5,000個）を載せた後、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cにて約1時間そのまま静置した。このシートに表2に示した培養液を加え、更に5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cに培養を続けた。

シートに接着した小型肝細胞はゆっくりと増殖し、シート上の培養第2日目において既に形態変化が観察された。シートの繊維に接着するため細胞が立方状になり盛んに分の細胞は周りを囲むコラーゲン繊維に接着するため細胞が立方状になり盛んに分裂した。狭い空間内で細胞が増えるために細胞間の接着面が大きくなった。適当な細胞密度になると細胞は分裂を停止し細胞質が大きくなった。細胞間には、細胞間結合がよく発達し、タイト結合で強固に結合し、その間には毛細胞管が形成され、その中には胆汁に類するものも分泌可能になった。また、ギャップ結合もよく発達するようになり、細胞間コミュニケーションが良くなった。細胞質には、ミトコンドリア、ゴルジ装置、ペルオキシソームなどの細胞内小器官がよく発達し、グリコーゲン顆粒もよく見られるようになった。これらの結果は小型肝細胞が生体内の成熟肝細胞と同様の機能を持ちうることを示すものである。

細胞外基質をかけなくても成熟化が誘導されるのはこのような物理的な要因で細胞が固定されるためと考えられる。

また、シート上の培養第7日～15日において、1  $\mu$ lの培養上清を電気泳動し、ウェスタンブロット解析にかけ、各バンドの相對強度を測定した。その結果、アルブミン、トランスフェリン、ハプトグロブリン、フィブリノーゲン等の成熟肝細胞に特徴的なタンパク質の分泌が顕著に増加したことが示された（図14～図17）。特にアルブミンの分泌はシート上の培養開始第2日目より顕著に見られた（図14）。

この実験においても、コラーゲンシート上で培養した小型肝細胞コロニーはコラーゲン被覆培養皿上で培養した小型肝細胞コロニーに比較して顕著に成熟化が起こることが示された。

実施例 5．小型肝細胞から誘導された肝組織の移植

実施例 4 に記載したように、コラーゲンシート上で小型肝細胞を 14 日間培養して形成された小型肝細胞コロニー由来の肝組織をシートごと無アルブミンラットに移植した。

麻酔下にラットの腹部を切開し、肝臓を露出させその約 2/3 を切除した。残存肝にシート上で形成された肝組織をシートごと培養液面、すなわちコロニー側を臓器側にして載せ、手術用ホッチキスでシートを固定し、切開部を縫合した。また、ラットには FK506 等の免疫抑制剤を投与した。

実施例 6．小型肝細胞を用いた、化合物の肝薬物代謝酵素誘導能の測定

実施例 2 で調整された小型肝細胞コロニーを約 200～250 コロニー/cm<sup>2</sup> になるようにコロニーごと培養皿（直径 60mm のディッシュ）に入れた。

培養液（1）（DMEM、10% FBS、10mM ニコチンアミド、1mM アスコルビン酸 2-リン酸、10ng/ml EGF、10<sup>-7</sup>M デキサメタゾン、0.5μg/ml インスリン、ペニシリン、ストレプトマイシン）にて 12～24 時間培養後、血清フリーの培養液（2）（DMEM、10mM ニコチンアミド、1mM アスコルビン酸 2-リン酸、10ng/ml EGF、10<sup>-7</sup>M デキサメタゾン、0.5μg/ml インスリン、ペニシリン、ストレプトマイシン、1% DMSO）に換えた。一日おきに培養液を交換しながら、更に 10 日間培養した後、培養液で 500 μg/ml に希釈した Matrigel を細胞の上に載せた。Matrigel 添加 4 8 時間後培養液を交換し、DMSO フリーの培養液（2）で更に 4 日間培養を続けた。Matrigel 添加後 6 日目に下記の表 3～6 に記載した薬剤を同表に示した濃度で投与し、薬剤添加 2 4 時間後に細胞を回収した。

エタノールはアルコール代謝に関与する薬物であり、クロマフィレートは抗高脂血症剤であり、フェノバルビタールは精神安定剤であり肝発癌プロモーター

作用を有することが知られており、プレグネノンはステロイドホルモンの一種で女性黄体ホルモンであるプロゲステロンの前駆体である。

タンパク質を 10% SDS-PAGE で分離後、ウエスタンブロッティング法により目的蛋白質を膜上に発色させた。プロット上のバンドの濃さをデンストメーターにより数値化した。

使用した一次抗体は、ヤギ抗-CYP2B1 抗体（300 倍希釈）、ヤギ抗-CYP3A2 抗体（300 倍希釈）、ヤギ抗-CYP2E1 抗体（1000 倍希釈）およびヤギ抗-CYP4A1 抗体（1000 倍希釈）（何れも第一化学薬品から購入）である。また 2 次抗体は DAKO 社より購入した HRP-結合抗-ヤギ/ヒツジ Ig（5000 倍希釈）。発色用基質は Pierce 社より購入した Super Signal West Dura（化学発光）を使用した。

表 3～6 は、成熟肝細胞における酵素の活性を 100% とした各酵素の相対活性を種々の薬剤のそれらの酵素の誘導能として示したものである。プレグネノンは 0.5% エタノールを含む溶液として、クロマフィレートは 0.5% DMSO を含む溶液として使用した。

表 3．CYP2B1 誘導能

薬剤	濃度 (mM)	CYP2B1 誘導能 (%)
フェノバルビタール	0	30.8
	0.75	37.4
	1.5	47.9
	3.0	46.9
	4.5	55.0



く特定の機能を有する薬剤のスクリーニングや薬剤の作用を推定することができる。

表 4．CYP3A2 誘導能

薬剤	濃度 (mM)	CYP3A2 誘導能 (%)
フレグネロン	対照 (0.5%エタノール)	94.9
	0.5×10 <sup>-3</sup>	115.5
	1.0×10 <sup>-3</sup>	141.0
	2.0×10 <sup>-3</sup>	148.1
	5.0×10 <sup>-3</sup>	153.2

表 5．CYP2E1 誘導能

薬剤	濃度 (mM)	CYP2E1 誘導能 (%)
エタノール	0	74.1
	250	76.5
	500	82.4
	750	98.8
	1000	86.4

表 6．CYP4A1 誘導能

薬剤	濃度 (mM)	CYP4A1 誘導能 (%)
クロファイブレート	対照 (0.5%DMSO)	74.1
	0.1	76.5
	0.25	82.4
	0.5	98.8
	0.75	86.4

本発明により、移植可能な肝組織の調製に適した小型肝細胞集塊を調製すること、およびその小型肝細胞集塊からの肝組織への成熟化誘導が簡便に行なえるようになる。特に生体吸収性シート上で本発明の小型肝細胞高含有コロニーから形成された肝組織はシートごと生体肝への移植が可能であるため、本発明により、損傷を受けた肝臓の修復を容易に行なうことができる。更に、本発明により、特定の薬剤に応答した代謝酵素の誘導において、成熟肝臓組織に非常に近い機能を有する細胞塊を得ることができる。従って本発明により、動物実験を行うことな

請求の範囲

1. コロニーを構成する総細胞の70%以上が小型肝細胞で占められている、小型肝細胞高含有コロニー。
2. コロニーを構成する総細胞数が10個～30個である、請求項1に記載の小型肝細胞高含有コロニー。
3. (i) 肝臓より肝細胞を分離すること、  
(ii) 分離された前記肝細胞を、実質細胞をより多く含む重畳画分と、非実質細胞をより多く含む実質細胞をより少なく含む軽畳画分とに分画し、前記軽畳画分を回収すること、  
(iii) 前記軽畳画分中の細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて培養し、小型肝細胞コロニーを形成させること、および、  
(iv) 総細胞数が10個～30個である小型肝細胞コロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法。
4. (i) コロニーを形成している小型肝細胞に酵素を作用させ、または、作用させずに培養皿から剥がし、回収すること、  
(ii) 回収された前記小型肝細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて継代培養し、総細胞数が10個～30個であるコロニーを形成させること、および、  
(iii) 前記総細胞数が10個～30個であるコロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法。
5. (i) 請求項1または2に記載の小型肝細胞高含有コロニーを培養すること、  
(ii) 前記培養された小型肝細胞高含有コロニーを含む前記培地に細胞外基質を添加すること、  
(iii) 前記細胞外基質を添加された培地で培養された小型肝細胞高含有コロニーを細胞外基質を含まない培地で更に培養すること、

を特徴とする、小型肝細胞高含有コロニーの肝組織への成熟化方法。

6. 培養開始時の小型肝細胞高含有コロニー密度が、200～1000コロニー/cm<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項5に記載の小型肝細胞高含有コロニーの肝組織への成熟化方法。

7. (i) 請求項1または2に記載の小型肝細胞高含有コロニーを生体吸収性シート上に置くこと、

(ii) 前記シートをシートごと培地中に置くことにより、前記シート上の小型肝細胞高含有コロニーを培養すること、  
を特徴とする、  
小型肝細胞高含有コロニーの肝組織への成熟化方法。

8. 培養開始時のシート上のコロニー密度が、200～1000コロニー/cm<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項7に記載の成熟化方法。

9. (i) 請求項1または2に記載の小型肝細胞高含有コロニーを生体吸収性シート上に置くこと、

(ii) 前記シートをシートごと無血清培地中に置くことにより、前記シート上の小型肝細胞高含有コロニーを培養すること、  
を特徴とする、移植用肝組織調製方法。

10. 培養開始時のシート上のコロニー密度が、200～1000コロニー/cm<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項9に記載の移植用肝組織調製方法。

11. 請求項5～8の何れか1項に記載の方法により成熟化した小型肝細胞高含有コロニーと化学物質とを共存させ、前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現が誘導または抑制される遺伝子を同定および/またはその発現量を定量することにより、前記化学物質の肝機能に関連した作用を in vitro で推定する方法。

12. 請求項5～8の何れか1項に記載の方法により成熟化した小型肝細胞高含有

有コロニーと化学物質とを共存させ、前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現が誘導または抑制される遺伝子を同定および／またはその発現量を定盤し、さらに前記誘導または抑制された遺伝子発現の誘導または抑制パターンを作用が既知の化学物質に対する遺伝子発現の誘導または抑制パターンと比較し、前記パターンと類似したパターンを有する化学物質の肝機能に関連した作用を前記小型肝細胞高含有コロニーと共存させた前記化学物質の肝機能に関連した作用として in vitro で推定する方法。

1 3．発現が誘導または抑制される遺伝子が薬物代謝酵素遺伝子である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

1 4．請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法によって成熟化した小型肝細胞高含有コロニーと化学物質とを共存させ、前記化学物質が前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導または抑制する能力を決定することにより、前記化学物質が肝臓において前記薬物代謝酵素の発現を誘導または抑制するかを決定する方法。

1 5．薬物代謝酵素遺伝子がチトクローム P450 酵素群に属する酵素をコードする遺伝子である、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

1 6．薬物代謝酵素遺伝子が CYP2B1、CYP3A2、CYP2E1、CYP4A1 をコードする遺伝子から選ばれる、請求項 1 5 に記載の方法。

1 7．請求項 5 ～ 8 の何れか 1 項に記載の方法により成熟化した小型肝細胞高含有コロニーと化学物質とを共存させ、前記小型肝細胞高含有コロニー中の細胞において発現が誘導される、または抑制される遺伝子を同定および／またはその発現量を定量することにより、前記化学物質の肝機能に関連した作用を in vitro で推定する方法。

FIG.1

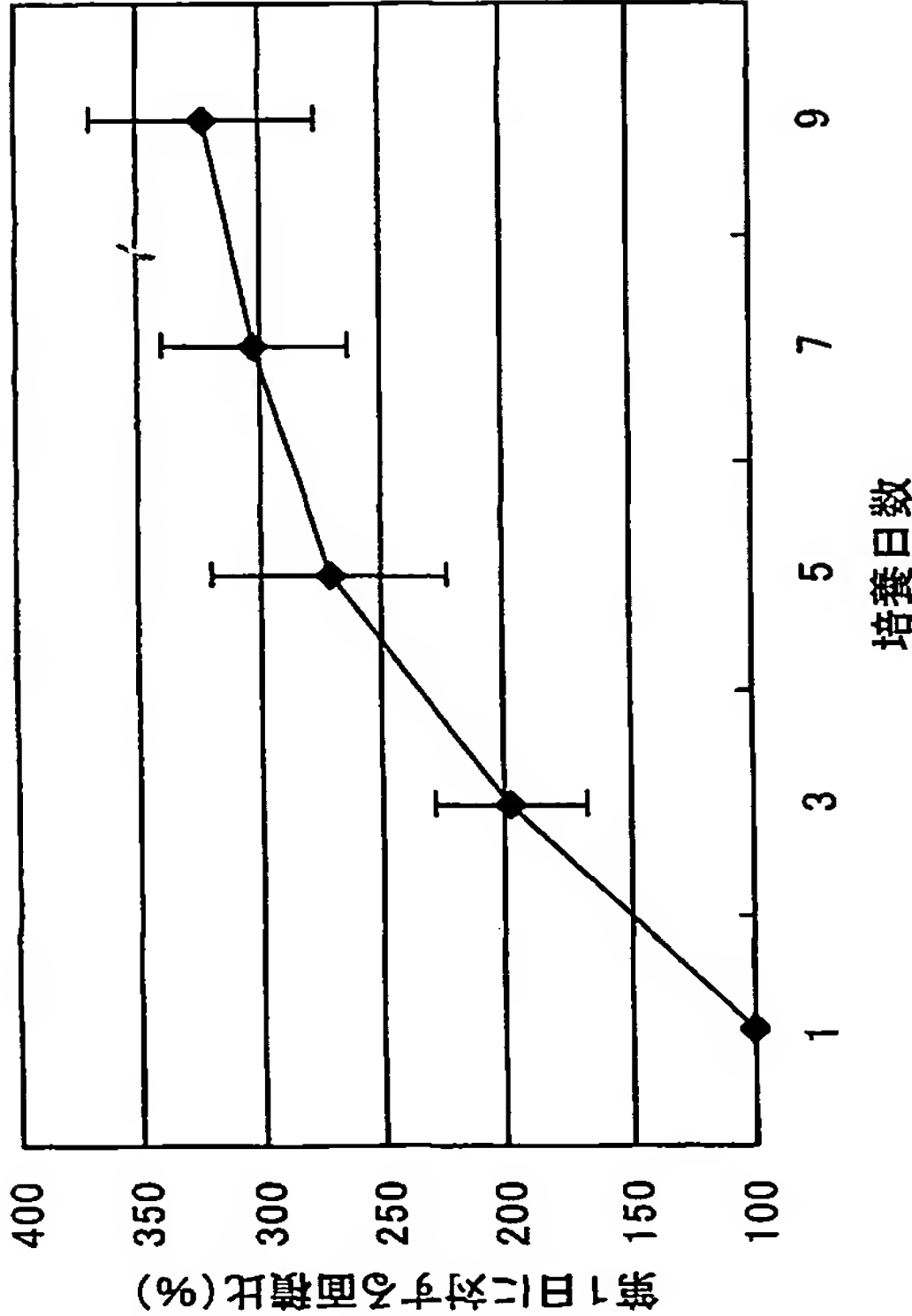


FIG.2

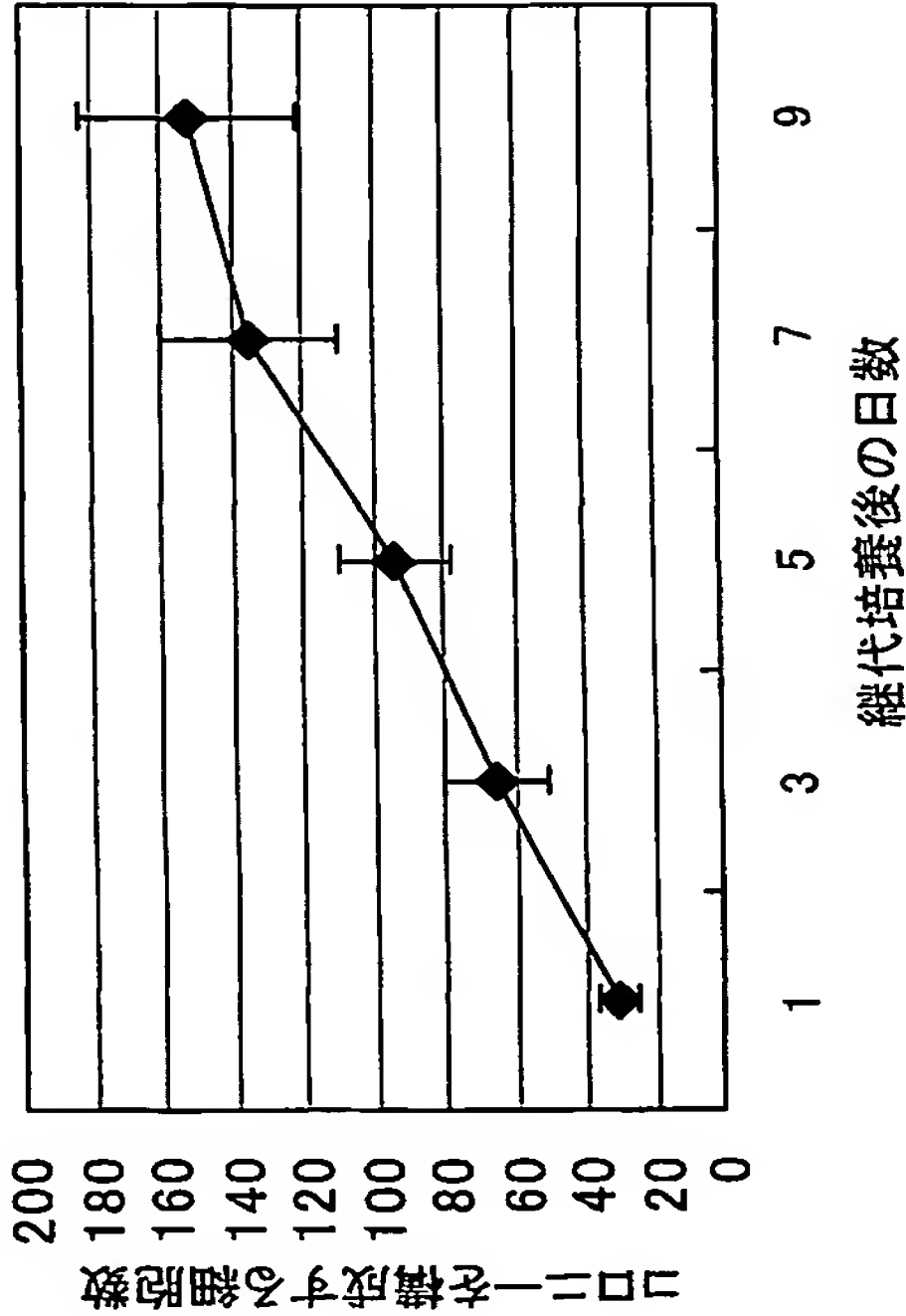




FIG.3

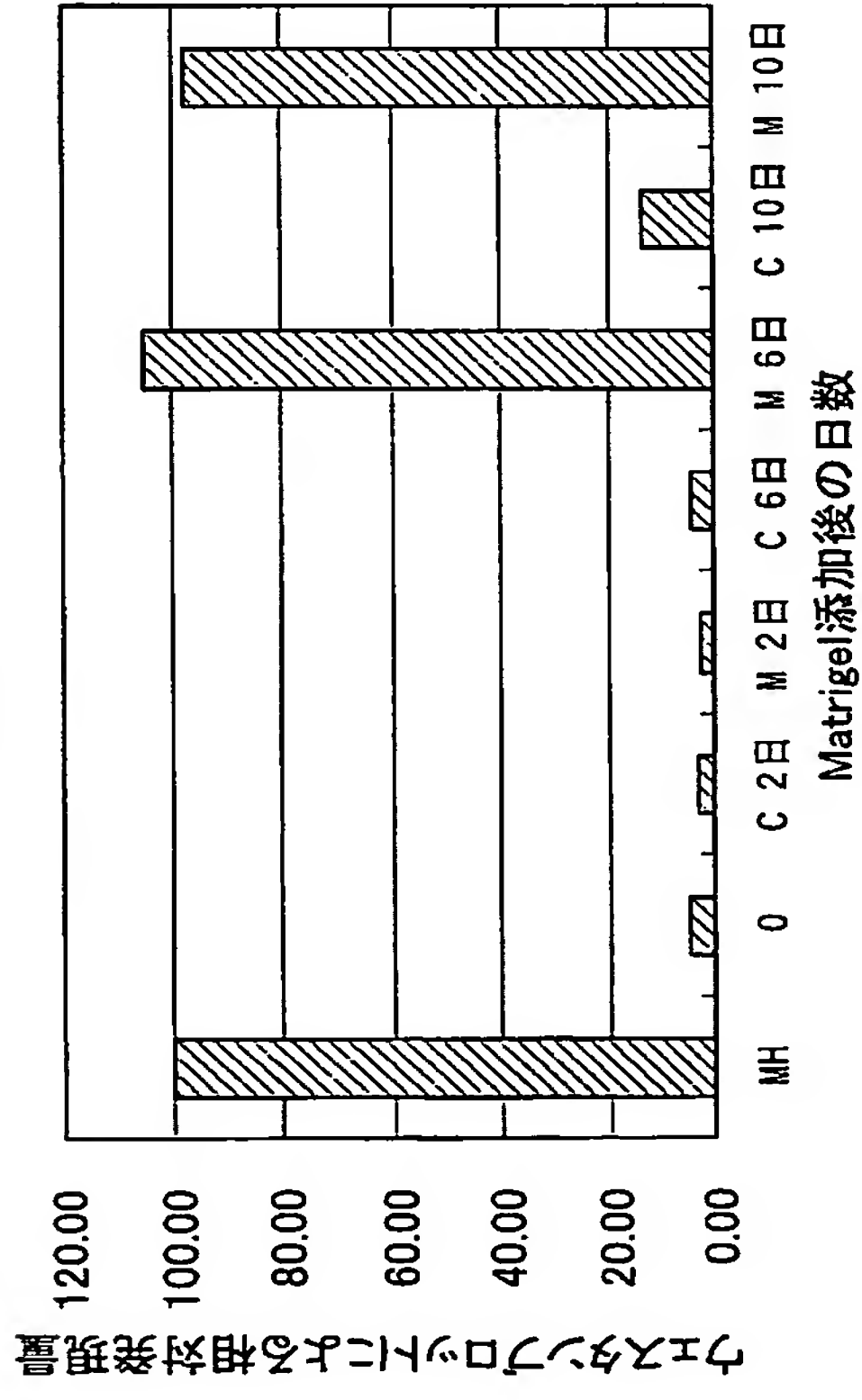


FIG.4

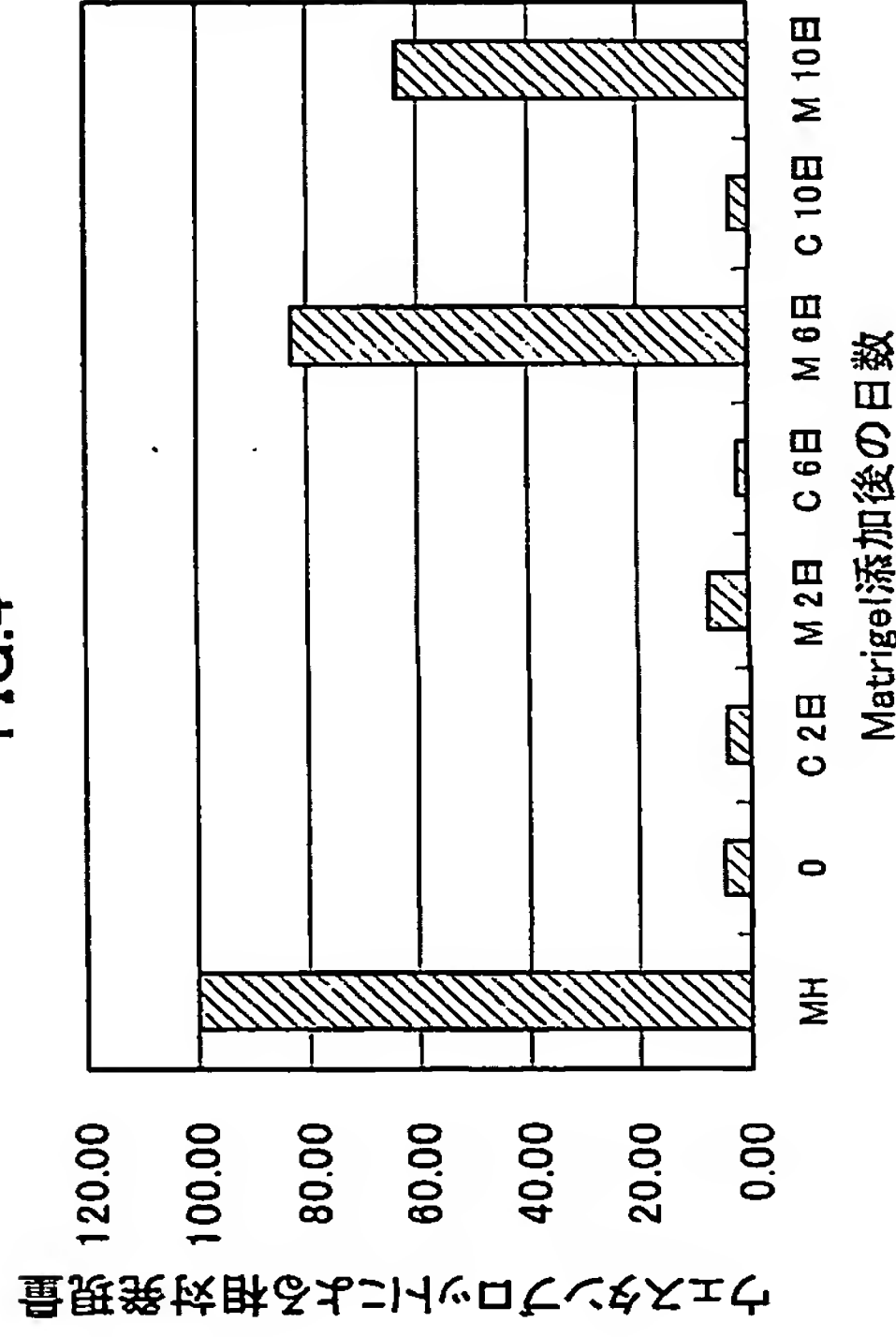


FIG.5

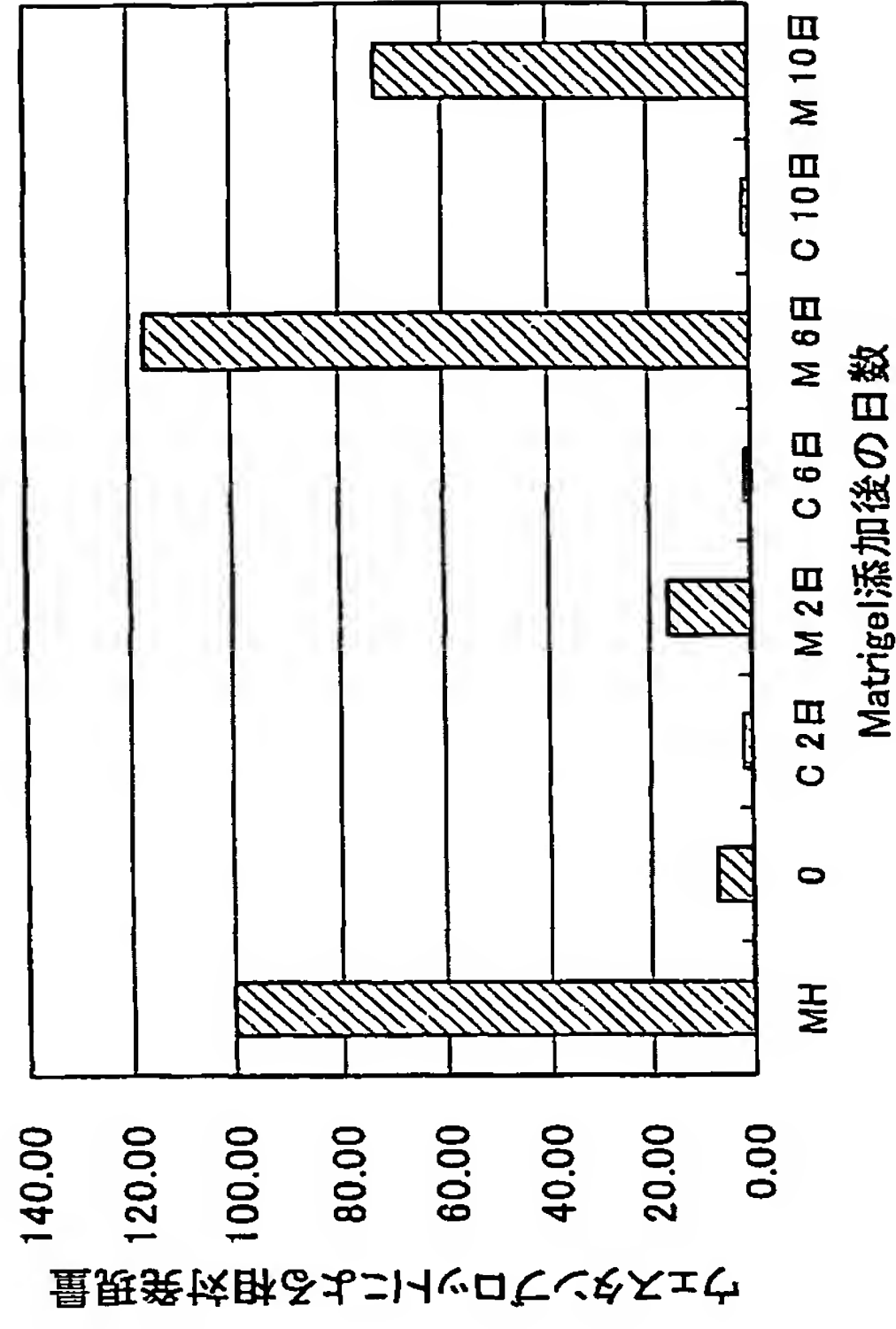


FIG.6

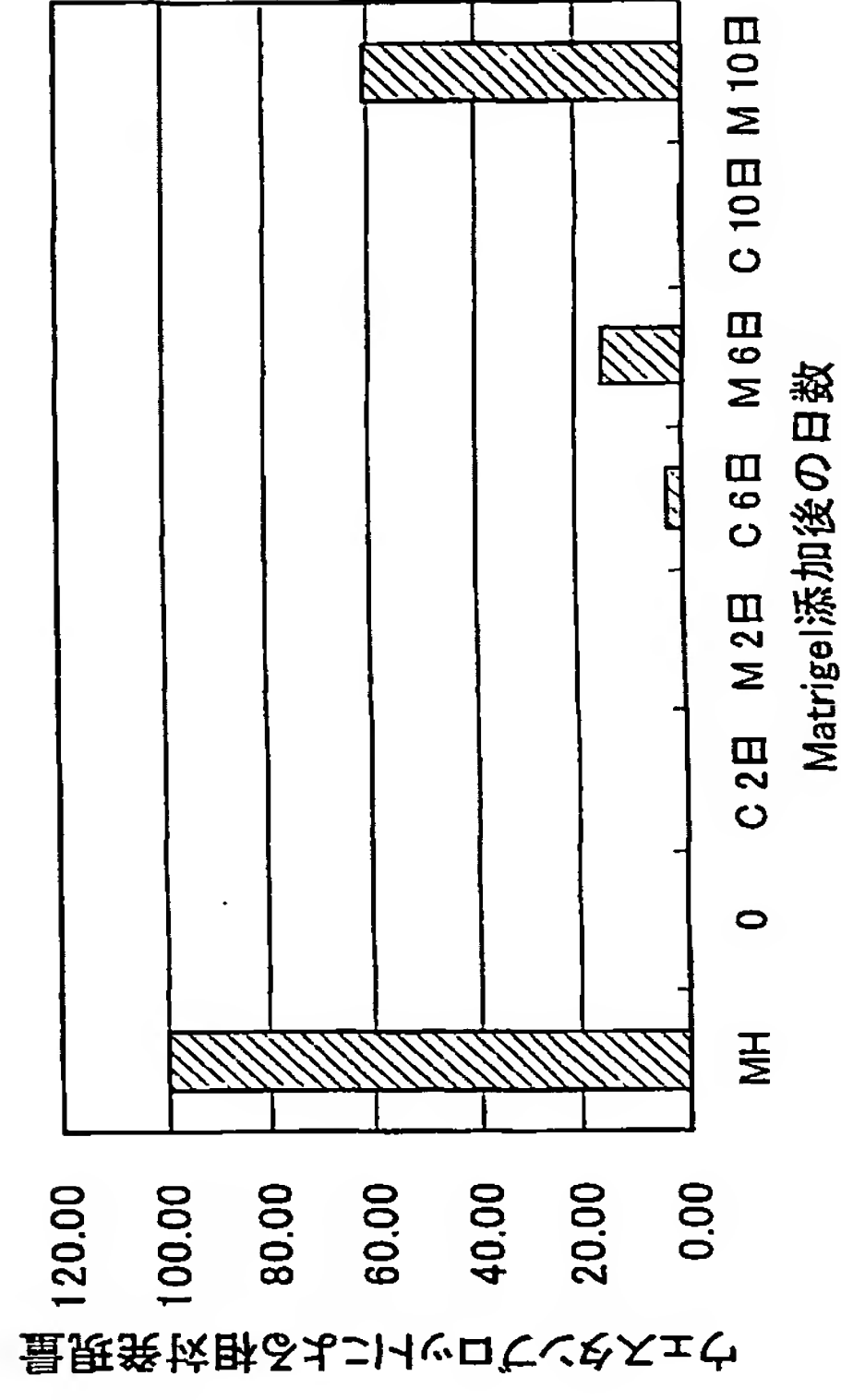


FIG.7

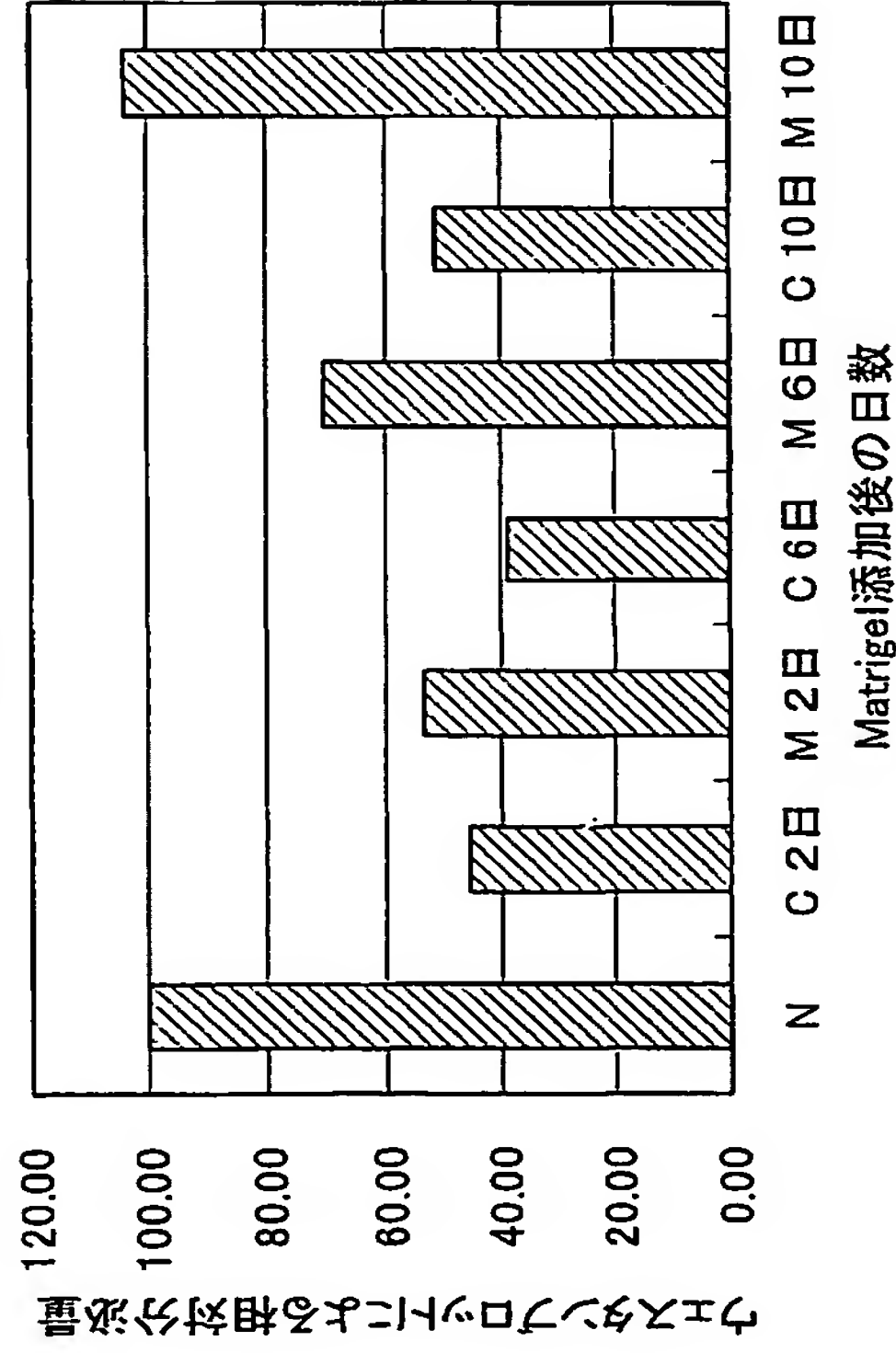


FIG.9

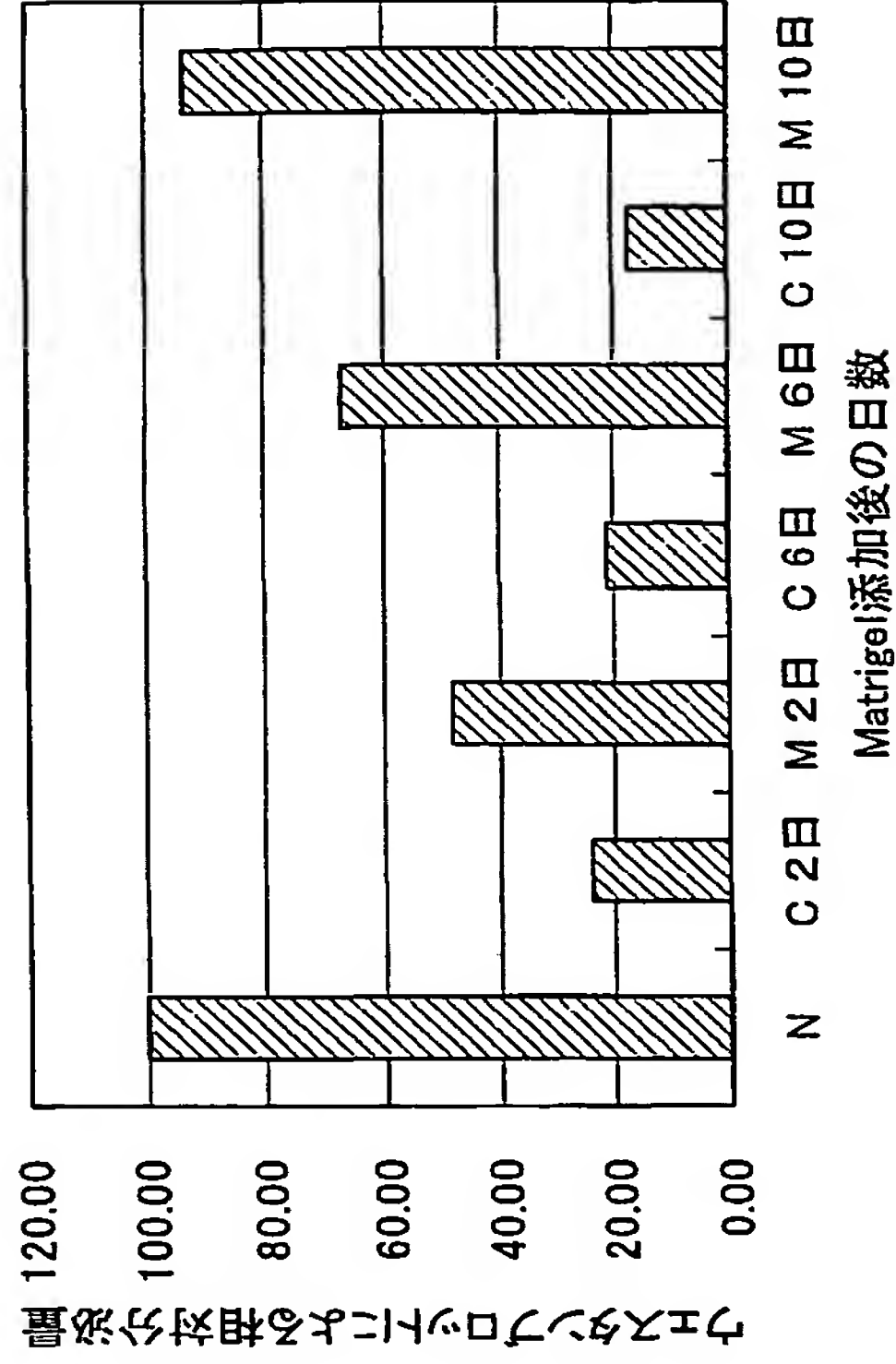


FIG.8

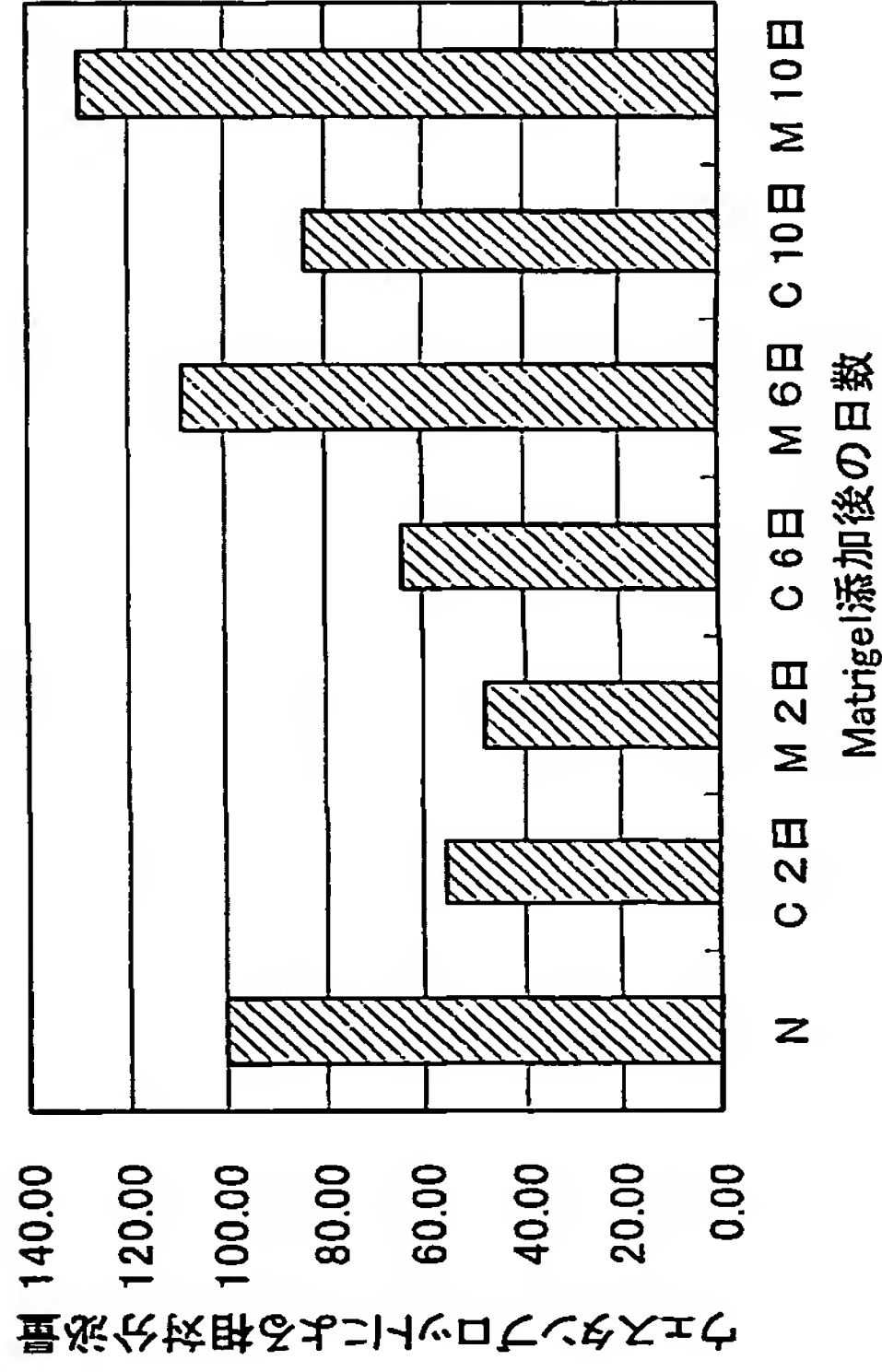


FIG.10

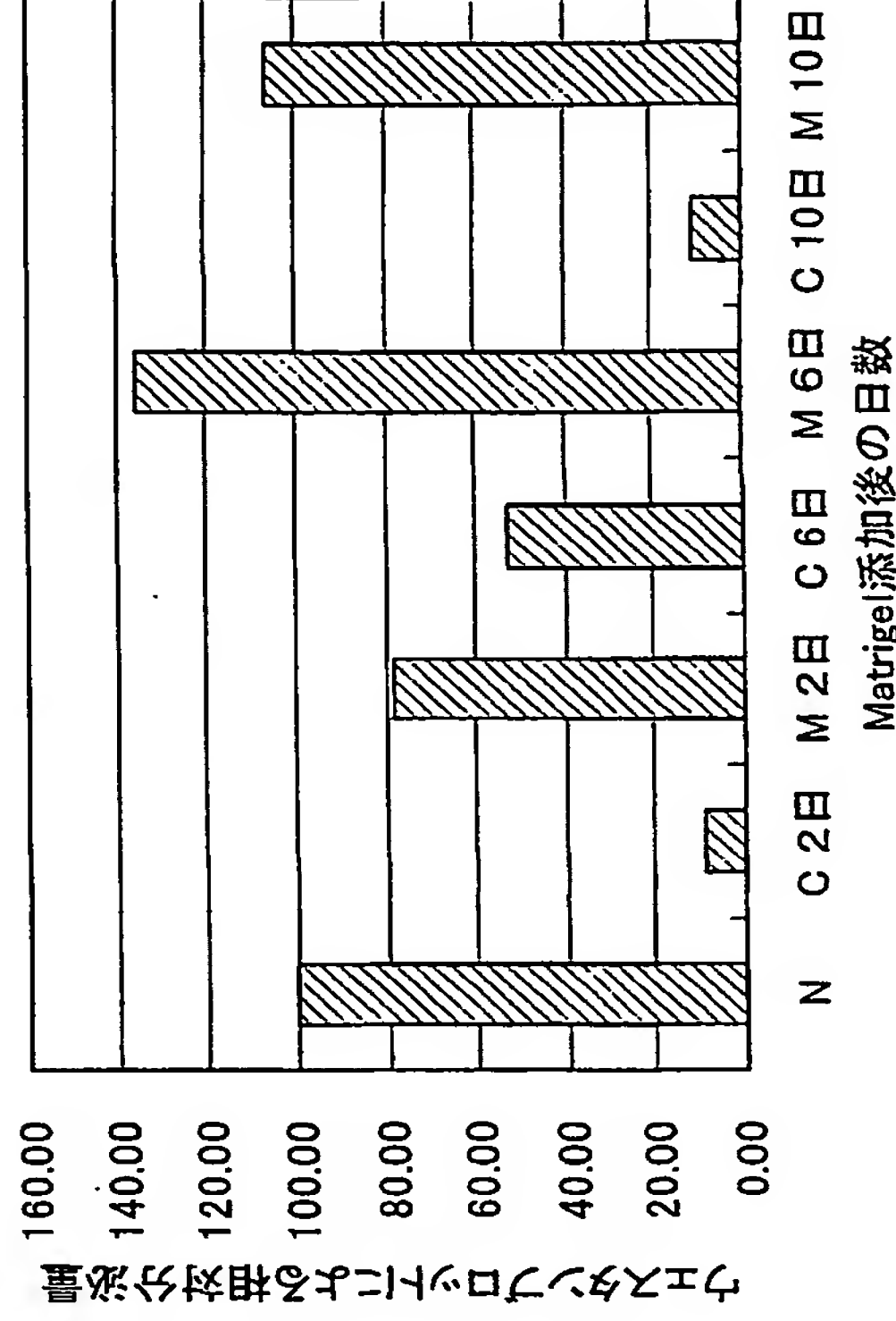


FIG.11

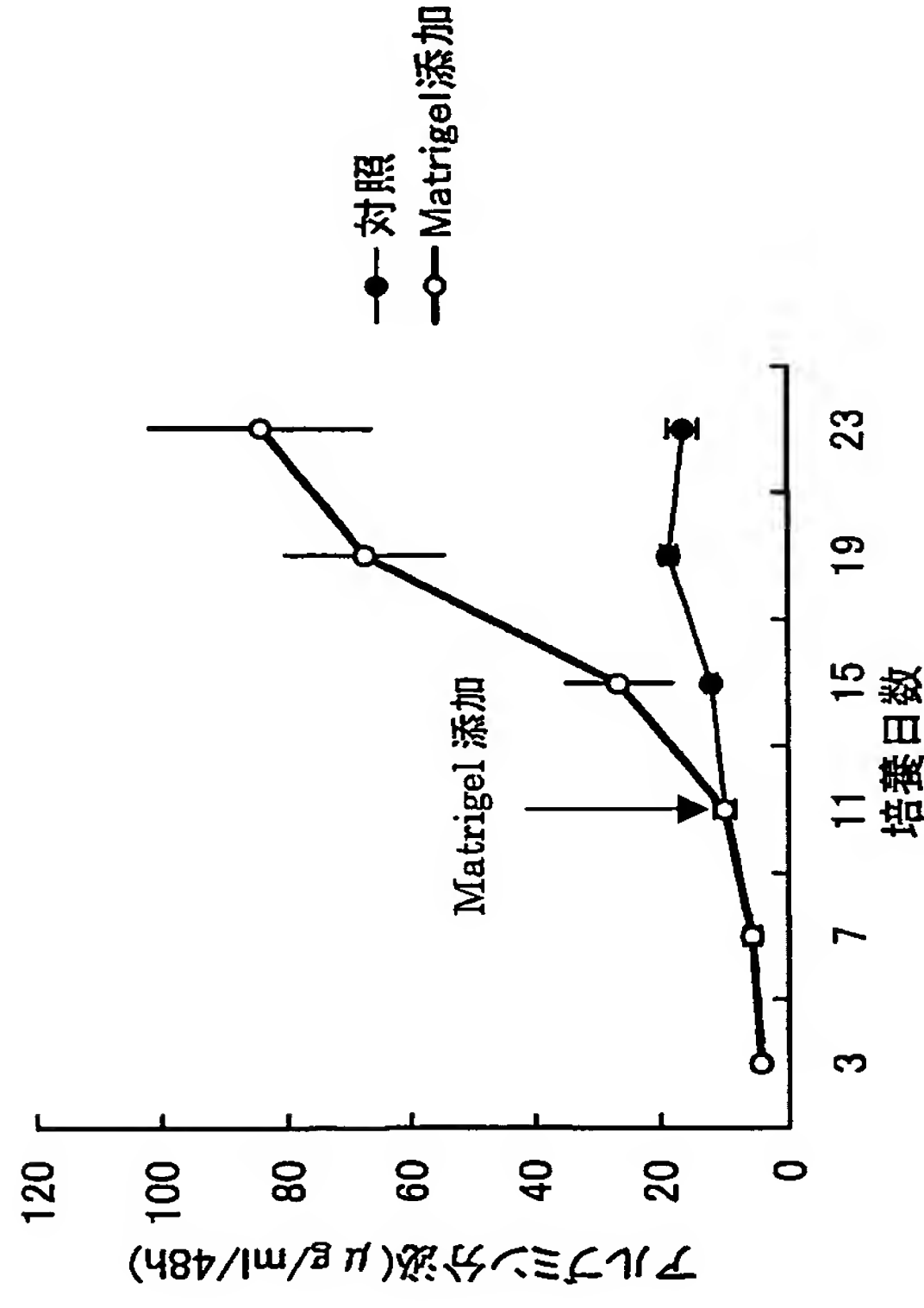


FIG.13

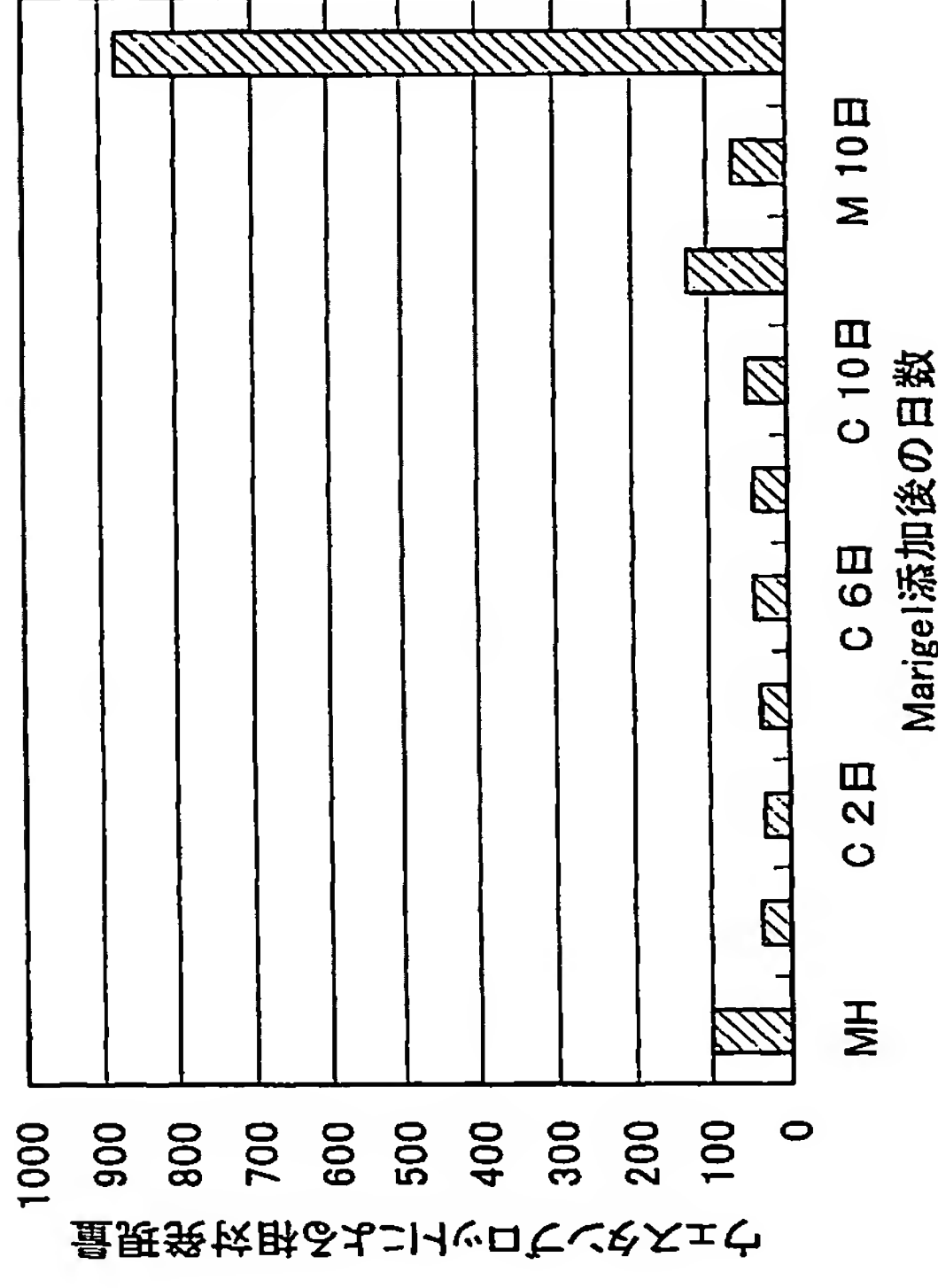


FIG.12

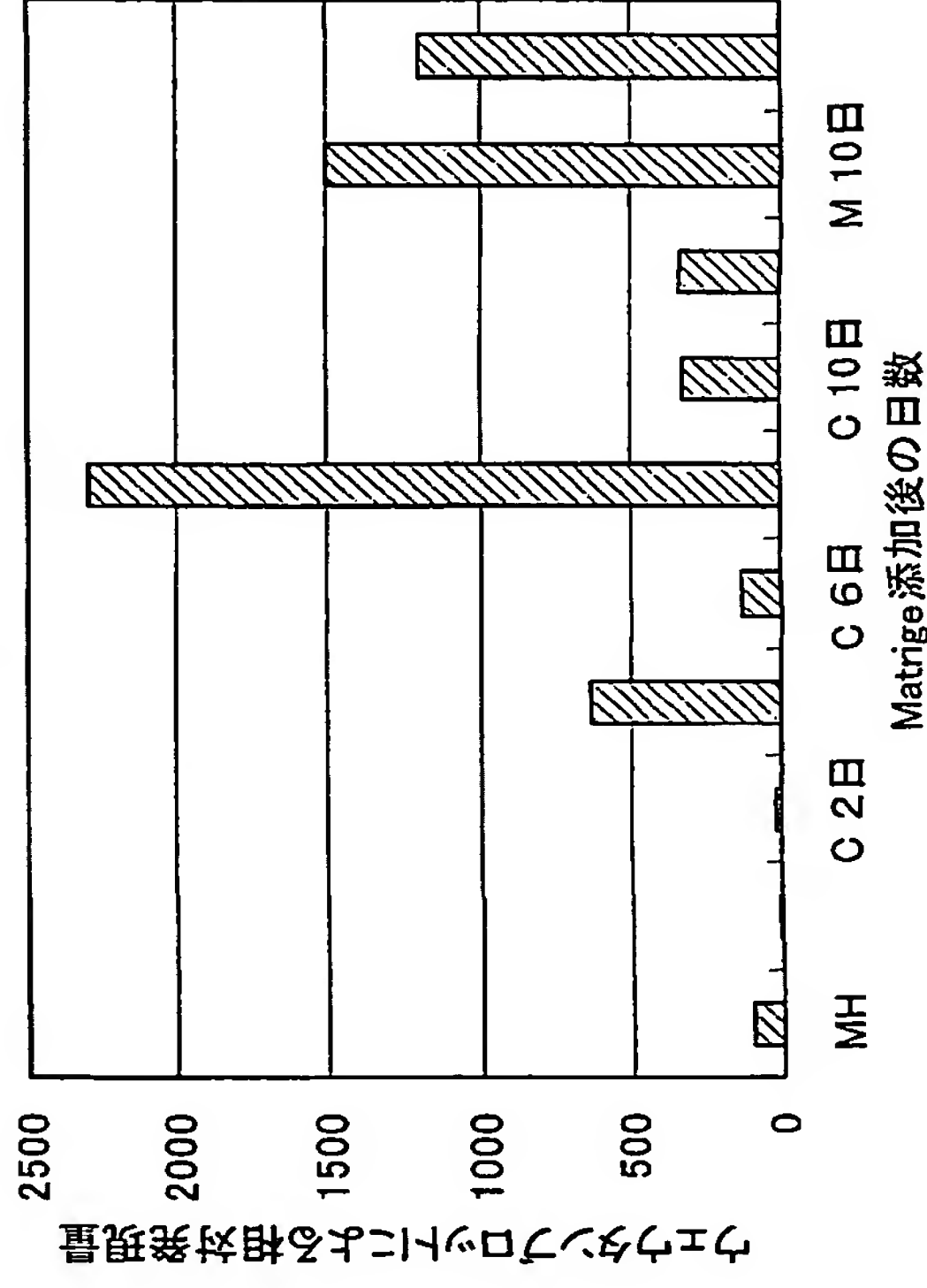


FIG.14

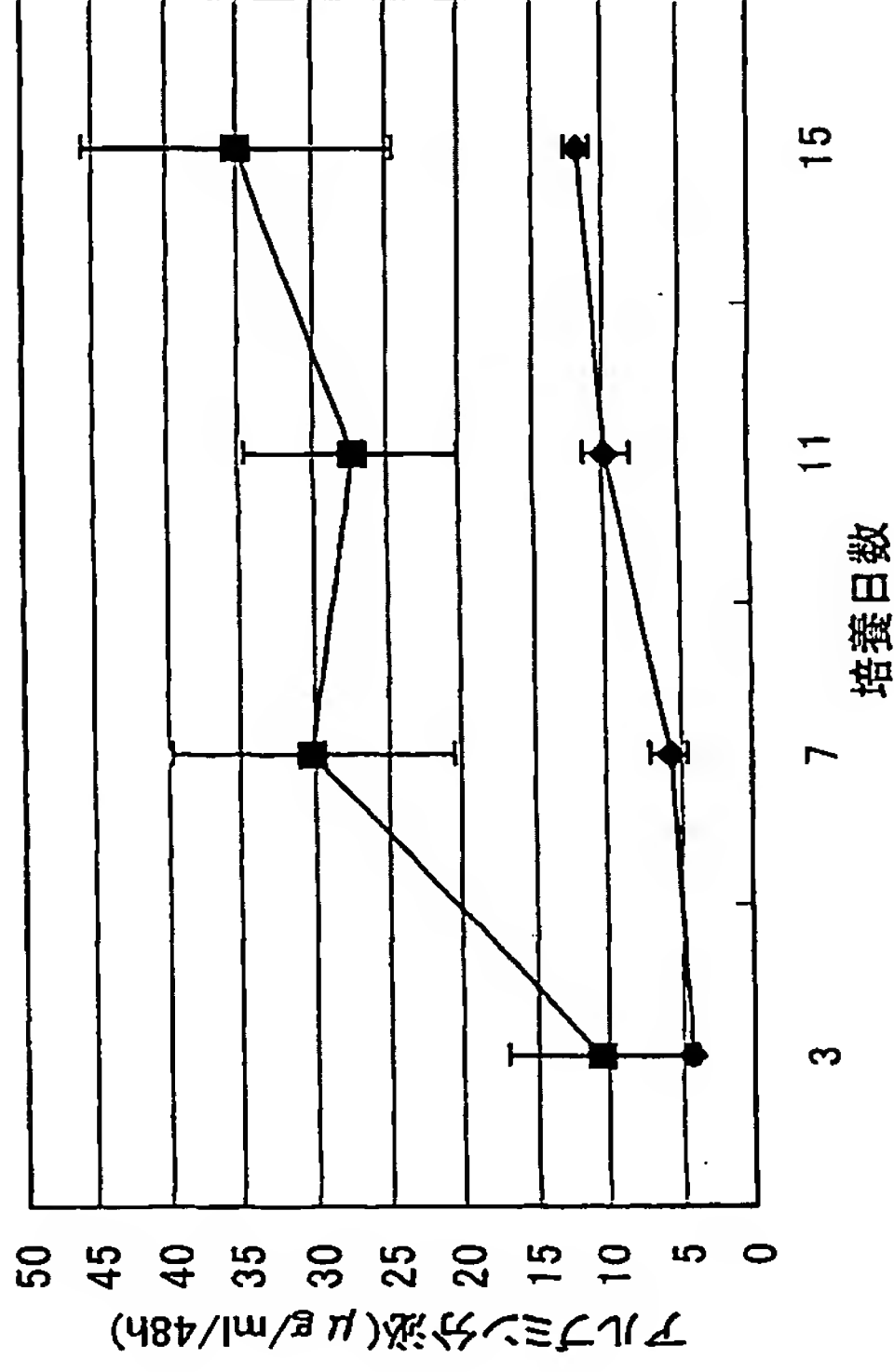




FIG.15

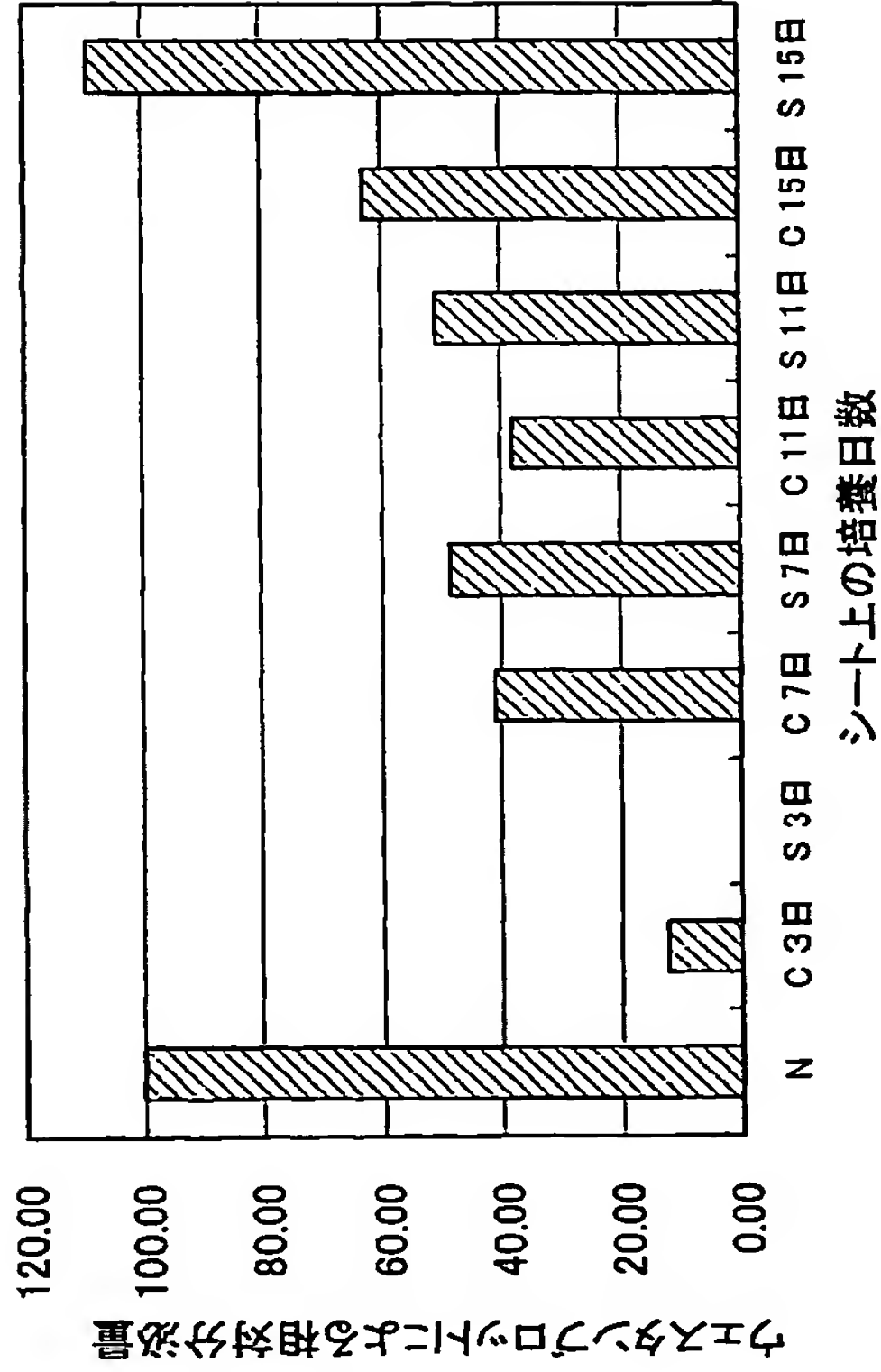


FIG.16

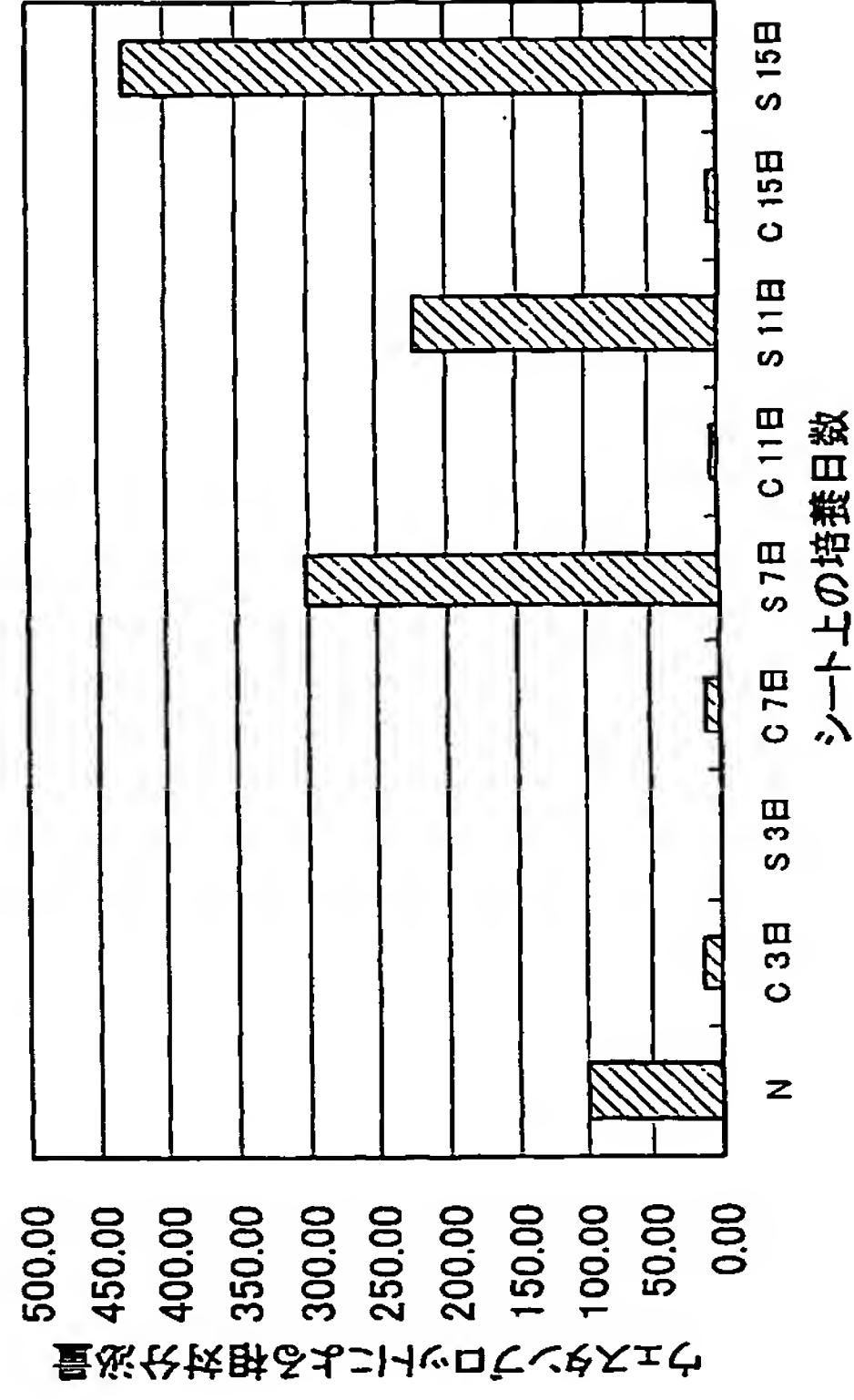
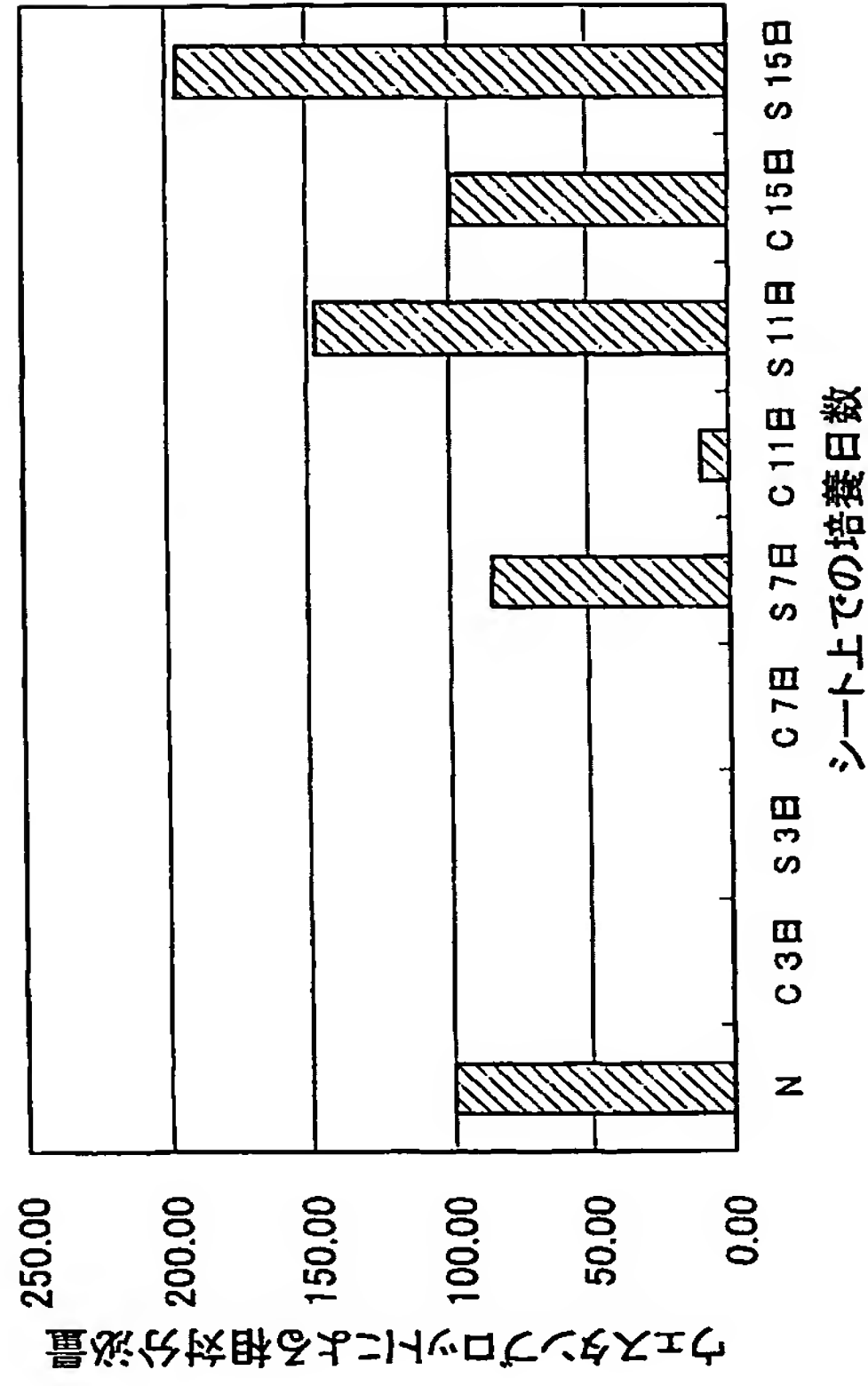


FIG.17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/03665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> C12N5/06, C12Q1/68, A61K45/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> C12N5/06, C12Q1/68, A61K45/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to claim No.
X Y	Toshihiro MITAKA, Yoichi MOCHIZUKI, "Kankan Saibo no Isshu dearu Small Hepatocytes no Zoshoku to Seijukuka ni Oyobosu Hi Jisshitsu Saibo no Yakuwari", Proceedings of the Japanese Society of Pathology, 15 March, 1999 (15.03.99), Vol.88, No.1, page 299, 3P-PM1-23	1-8 10-17
X Y	MITAKA, T. et al., Reconstruction of Hepatic Organoid by Rat Small Hepatocytes and Hepatic Nonparenchymal Cells. Hepatology, January 1999, Vol.29, No.1, pages 111 to 125	1-9 10-17
Y	Ohno, Y. et al., Toxicity Evaluation by using primary cultured rat hepatocytes. The Journal of Toxicological Sciences, Vol.16, Supplement II, pages 121 to 124 (1991)	10-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 05 June, 2002 (05.06.02)		Date of mailing of the international search report 25 June, 2002 (25.06.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/03665

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Koichi HIROTA, "Yasuo ONO, "Shodai Baiyo Kansaibo ni okeru Kagaku Busshitsu Taisha", Eiyogaku Zasshi, Vol.46, No.4, pages 155 to 162 (1988)	10-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

BEST AVAILABLE COPY

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JPO2/03665	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N5/06, C12Q1/68, A61K45/00			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N5/06, C12Q1/68, A61K45/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	三高俊広・望月洋一、 肝幹細胞の一種である Small hepatocytes の増殖と成熟化に及ぼす非実質細胞の役割 日本病理学会誌, 1999. 03. 15, 第88巻第1号, p. 299, 3P-PM1-23	1-8	
Y		10-17	
X	MITAKA, T. et al., Reconstruction of Hepatic Organoid by Rat Small Hepatocytes and Hepatic Nonparenchymal Cells. HEPATOLOGY, January 1999, Vol. 29, No. 1, pp. 111-125	1-9	
Y		10-17	
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展覧等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 05.06.02		国際調査報告の発送日 25.06.02	
国際調査機関の名称及び 日本国特許庁 (ISA/JJP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明 照 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

BEST AVAILABLE COPY

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JPO2/03665	
C (続き) . 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	Ohno, Y. et al., Toxicity Evaluation by using primary cultured rat hepatocytes. The Journal of Toxicological Sciences, Vol. 16, Supplement II, pp. 121-124 (1991)	10-17	
Y	広田晃一・大野泰雄、 初代培養肝細胞における化学物質代謝、 栄養学雑誌 Vol. 46, No. 4, pp. 155-162 (1988)	10-17	

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)